

THESIS

MUNICH

1963

ÜBER DAS VERHALTEN DER AKTIVIERTEN ESSIGSÄURE
DER LEBER BEI EXPERIMENTELLER KETOSE

Ludwig Weiss

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik

München

Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel

ÜBER DAS VERHALTEN DER AKTIVierten ESSIGSÄURE
DER LEBER BEI EXPERIMENTELLER KETOSE

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Weiss

aus München

1963

Referent: Prof. Dr. O. Wieland

Coreferent: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

Dekan: Prof. Dr. A. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 6. 1963

INHALT

<u>Einleitung</u>	1
<u>Ergebnisse</u>	6
Bestimmung von Acetyl-CoA beim Langzeit-Diabetes	6
Bestimmung von HMG-CoA beim Langzeit-Diabetes	9
Bestimmung von Acetyl-CoA beim akuten Diabetes	11
Bestimmung von Acetyl-CoA bei alimentärer Ketose	12
Papierchromatographie von CoA und CoA-Estern	17
<u>Diskussion</u>	18
<u>Experimenteller Teil</u>	33
Tiere und Ketoseerzeugung	33
Organentnahme und Verarbeitung	38
Bestimmung von Acetyl-CoA und HMG-CoA mit Arylaminacetylase	40
Bestimmung von Acetyl-CoA mit Citrat-kondensierendem Enzym	44
Bestimmung von Acetacetyl-CoA	48
Kolorimetrische Bestimmung von HMG-CoA	49
Enzymdarstellungen	52
Papierchromatographie	59
Statistische Berechnung	68
<u>Zusammenfassung</u>	70
<u>Literatur</u>	72

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

AA-ase	= Arylaminacetylase
AcAc	= Acetacetat
Ac-CoA, Acetyl-CoA	= Acetyl-Coenzym A
AcAc-CoA, Acetacetyl-CoA	= Acetacetyl-Coenzym A
ADP	= Adenosin-5-diphosphat
ASES	= Acetessigsäure synthetisierendes Enzymsystem
ATP	= Adenosin-5-triphosphat
CE	= Citrat-kondensierendes Enzym
CoA, CoA-SH	= Coenzym A
DAC	= N-S-Diacetylcysteamin
Desmolase	= HMG-CoA-Desmolase
DPN	= Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	= Diphosphopyridinnucleotid, reduziert
EE	= Enzymeinheiten
FAD	= Flavinadenindinucleotid
GSH	= Glutathion, reduziert
HMG-CoA	= β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym A
β -HAD	= β -Hydroxyacyldehydrogenase
HIV-CoA	= β -Hydroxy-isovaleryl-Coenzym A
MC-CoA	= β -Methyl-Crotonyl-Coenzym A

MDH	= Malatdehydrogenase
μM , μMol	= Mikromol = 10^{-6}Mol
nM, nMol	= Nanomol = 10^{-9}Mol
PCS	= Perchlorsäure
PNA	= p-Nitroanilin
TPN	= Triphosphopyridinnucleotid
TPNH	= Triphosphopyridinnucleotid, reduziert
TRIS-Puffer	= Pufferlösung aus Tris- hydroxymethylaminomethan



Digitized by the Internet Archive
in 2026

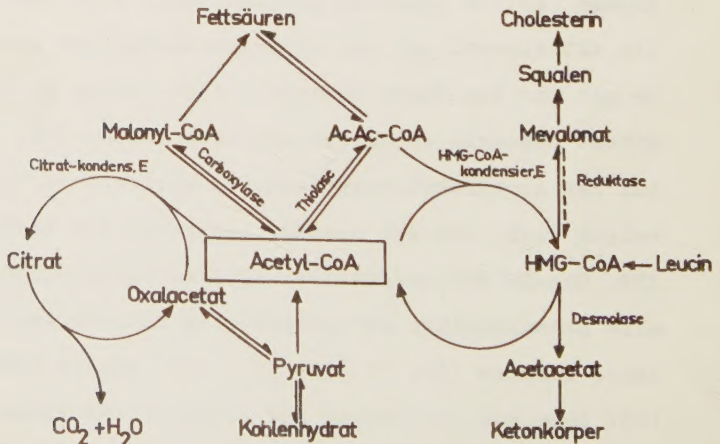
Bereits im Jahre 1922 vertrat Heinrich Wieland (107) die Ansicht, daß der Abbau der Zucker zur Bildung von Essigsäure führe. Mit der Aufstellung des sog. Citronensäurecyclus nach Krebs (52, 53) wurde der Endweg für den oxydativen Abbau der Kohlenhydrate aufgezeigt, doch ließ sich damals die Essigsäure noch nicht in das cyclische Geschehen einordnen. Erst 1945 wurde durch Verwendung von Isotopen der Beweis erbracht, daß Acetat im Verlauf des Kohlenhydratabbaues entsteht und im Citronensäurecyclus verbrannt wird (7, 82, 105, 106). Die Annahme der freien Säure als Intermediärprodukt war jedoch unbefriedigend. So sprach Lynen 1942 von einer "aktivierten Essigsäure" (62), deren Reaktionsfähigkeit weit über der der freien Säure liegt. Bei Untersuchungen der biologischen Acetylierung von Sulfanilamid fand Lipman (60) im frischen Leberkochsaft eine Substanz, die aktivierend auf das Acetylierungssystem einwirkte. Er gab ihr den Namen Coenzym A (58). Einen ähnlichen Effekt bemerkte schon vor ihm Nachmansohn (75, 76) bei der Acetylcholinsynthese. Im weiteren Verlauf zeigte sich, daß ein System, bestehend aus Acetat, ATP, CoA-SH und enzymatisch aktivem Leberhomogenat alle Eigenschaften der geforderten aktivierten Essigsäure aufwies (63, 77, 88, 92). 1951 gelang Lynen (63) dann die Isolierung und Strukturermittlung dieser "aktivierten Essigsäure" aus Hefekochsaft,

die er als Acetyl-Coenzym A erkannte.

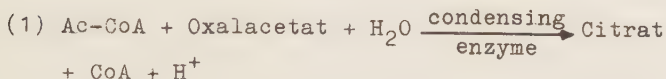
Neben der Möglichkeit der Bildung von Acetyl-CoA bei der Oxydation von Kohlenhydraten ergab sich, daß auch bei der Fettverbrennung in beträchtlichem Maße Acetyl-CoA anfällt (64, 94). Durch Arbeiten von Knoop (50, 51), Embden (26, 27) und Dakin (15, 16, 17, 14) wurde zuerst auf die Möglichkeit eines successiven Entstehens von C_2 -Bruchstücken beim Abbau der Fettsäuren hingewiesen.

Das zum überwiegenden Teil durch die Oxydation von Kohlenhydrat und Fett gebildete Acetyl-CoA nimmt im intermediären Stoffwechsel eine Schlüsselstellung ein, wie aus Abb. 1 hervorgeht.

Abb. 1: HAUPTWEGE DES ACETYL-CoA IN DER LEBER



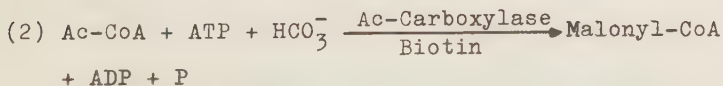
Durch Citratbildung mit Oxalacetat am condensing enzyme tritt Acetyl-CoA in den Citronensäurecyclus ein (94) (Gl. 1):



Im Verlauf des Krebscyclus verbrennt es zu Kohlendioxyd und Wasser, während Oxalacetat wieder freigesetzt wird.

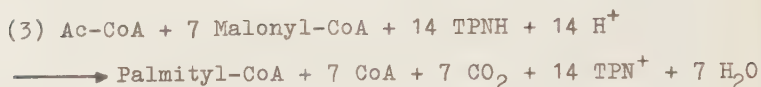
Vom Acetyl-CoA ausgehend, stehen der Fettsäurebiosynthese zwei grundsätzlich verschiedene Wege offen. Im Mitochondrium besteht die Möglichkeit durch einfache Umkehr der β -Oxydation höhere Fettsäuren aufzubauen (85). Daneben kann im Cytoplasma der Leberzelle der Fettsäureaufbau über folgenden Mechanismus ablaufen:

Durch eine Fixierung von CO_2 am Acetyl-CoA wird die Synthese eingeleitet. Aus Acetyl-CoA, ATP und CO_2 entsteht, katalysiert von der Acetyl-Carboxylase in einer biotinabhängigen Reaktion (102), Malonyl-CoA (Gl. 2):

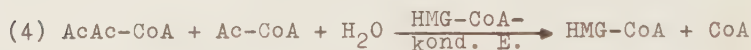


Unter der Wirkung der "Synthetase" erfolgt dann, in Gegenwart von TPNH, aus Malonyl-CoA und wiederum

Acetyl-CoA die Umwandlung in Fettsäuren (6, 67, 101)
(Gl. 3):



Andererseits wird Acetyl-CoA durch Kondensation mit
Acetacetyl-CoA in den HMG-CoA-Cyclus eingeschleust
(65) (Gl. 4):



Das als Reaktionspartner dienende Acetacetyl-CoA
entsteht seinerseits durch Vereinigung von zwei
Molekülen Acetyl-CoA unter Katalyse des Enzyms
 β -Ketothiolase (64) (Gl. 5):



Der 1958 von Lynen und Mitarbeitern (65) aufgezeigte
Cyclus führt unter Spaltung des HMG-CoA in einer
durch das Enzym HMG-CoA-Desmolase und Mg^{++} kataly-
sierten Reaktion zu Acetacetat (Gl. 6):

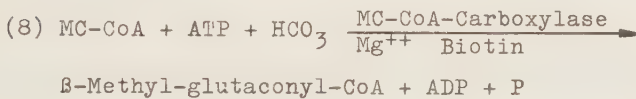


Ein beim Abbau der Aminosäure Leucin ent-
stehendes CoA-Derivat der β -Hydroxy-isovalerialan-
säure führt ebenfalls zur Bildung von HMG-CoA
(2, 47, 48, 71). Dieser Weg verläuft über drei
Zwischenstufen. Zuerst katalysiert die Crotonase

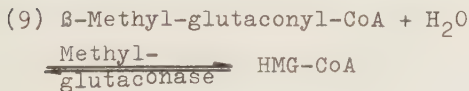
die Dehydratisierung von β -Hydroxy-isovaleryl-CoA zu β -Methyl-crotonyl-CoA (Gl. 7):



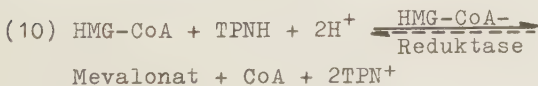
β -Methyl-crotonyl-CoA wird von der Methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase, einem "Biotinenzym", zu β -Methyl-glutaconyl-CoA carboxyliert (Gl. 8):



Im letzten Schritt katalysiert die Methylglutaconase die Hydratisierung von β -Methyl-glutaconyl-CoA zu HMG-CoA (Gl. 9):



Neben seiner Bedeutung als Zwischenprodukt auf dem Wege zur Acetessigsäure stellt das HMG-CoA gleichzeitig die Ausgangssubstanz der Cholesterinsynthese dar (5). Der erste Schritt dieser Reaktionsfolge führt über eine TPNH-abhängige Reduktion zur Mevalonsäure (28, 49) (Gl. 10):



Es ist nun seit langem bekannt, daß beim Diabetes in vermehrtem Maß Acetessigsäure gebildet

wird. Nachdem die oben aufgeführten Stoffwechselvorgänge bevorzugt in der Leber stattfinden, erschien es angebracht, bei experimenteller Ketose den Gehalt der Leber an Acetyl-CoA und HMG-CoA als den wichtigsten Zwischenprodukten im Syntheseweg der Acetessigsäure zu untersuchen.

ERGEBNISSE

A. Quantitative Bestimmung der CoA-Derivate

1. Metabolitbestimmungen bei mäßiger Ketose:

Infolge der beim Diabetes gestörten Glykolyse ist anzunehmen, daß zur Deckung des Energiebedarfes vermehrt der Weg der Fettoxydation und vielleicht des Eiweißabbaues beschritten wird. Diese Vorstellung ließ einen Anstieg der aktivierten Essigsäure erwarten. Aufbauend auf einer von Tabor und Mitarbeitern (98) beschriebenen Methode wurde auf optisch-enzymatischem Wege in angereicherten Leberhomogenaten von normalen, chronisch alloxandiabetischen und hungernden Ratten neben Acetyl-CoA auch HMG-CoA quantitativ bestimmt. (Vgl. dazu 108, 109). Die Herstellung der Leberhomogenate bedingte, daß entsprechend der von Bücher vorgeschlagenen Definition (39) nur eine Aussage über den "Metabolitgehalt" der Leber gegeben wird. Eine Angabe über

die Verteilung der getesteten Stoffe in den verschiedenen Räumen der Zelle ist damit nicht verbunden.

Der Blutgehalt an Acetessigsäure wurde mit einer von Walker (103) angegebenen Methode bestimmt. Im Mittel betrug der Acetacetatgehalt⁺) bei den Tieren mit mäßiger Ketose 0,5 mg% gegenüber 0,2 mg% bei den Normaltieren.

a. Ergebnisse der Acetyl-CoA-Bestimmung:

Sowohl beim chronischen Diabetes als auch im Hunger ließen sich keine Veränderungen des Acetyl-CoA-Gehaltes der Rattenlebern nachweisen. Auffallend bei den Versuchsergebnissen ist eine große Streuung der Acetyl-CoA-Werte, vor allem bei den Normaltieren. Ein sicherer Vergleich der Mittelwerte kann auf Grund dieser Streuung nicht gegeben werden.

⁺) Für die Überlassung dieser Daten möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. O. Wieland, II. Med. Klinik München, herzlich danken.

Tab. 1: DER GEHALT DER RATTENLEBER AN ACETYL-CoA
UND HMG-CoA BEI CHRONISCHEM DIABETES UND
HUNGER

Normal		Chron. diabet.		Hunger 48-76 Std.	
Ac-CoA	HMG-CoA	Ac-CoA	HMG-CoA	Ac-CoA	HMG-CoA
8,14	1,53	9,27	2,47	11,30	3,98
3,48	1,36	7,95	2,57	9,20	2,91
4,13	--	8,53	3,84	9,05	2,56
9,70	--	18,30	3,42	17,90 ^{a)}	4,20 ^{a)}
5,70	1,83	15,20	3,66		
15,20	3,84	17,10	--		
18,00	--	11,80	3,53		
6,95	2,21	22,50	2,60		
33,20	2,56	27,10	1,95		
38,80	1,70	22,50	3,28		
17,60	1,02	13,70	2,10		
18,10	1,56	23,60	2,95		
36,00	2,72	17,00	4,28		
26,00	1,27	16,80	1,76		
		11,70	2,28		
M: 17,21	1,96	16,20	2,91	14,45	3,78
s: 12,10	0,825	5,87	0,768	--	--
Differenz:		- 6% ^{b)}	+ 48,5%	- 17%	+ 93%

Legende zu Tabelle 1, Seite 8:

Alle Werte sind in nMol pro Gramm Frischleber angegeben. Die Erhöhung von HMG-CoA um 48,5 % bei den diabetischen Tieren ist statistisch signifikant ($P < 0,01$; vgl. S. 68).

a) Werte aus vier in einem Gemeinschaftsansatz verarbeiteten Lebern. Die Berechnung der Standardabweichung und der Wahrscheinlichkeit P ist hier nicht möglich, da nicht alle Einzelwerte bekannt sind.

b) Statistisch nicht signifikant.

b. Ergebnisse der HMG-CoA-Bestimmung:

Anders verhält es sich bei den für HMG-CoA gefundenen Werten (s. Tab. 1). Die Leber von chronisch alloxandiatetischen Ratten zeigt eine statistisch gesicherte Gehaltszunahme an HMG-CoA um annähernd 50 % gegenüber den Normaltieren. Bei den Hungertieren ergab sich sogar eine Erhöhung um mehr als 90 %. Der bei teilweise den gleichen Tieren gefundene Anstieg des Acetacetatgehaltes in der Leber diabetischer und hungernder Ratten (s. Diss. Löffler (61)) deckt sich mit der hier gefundenen Veränderung des HMG-CoA, der direkten Vorstufe des Acetacetates (s. Abb. 2).

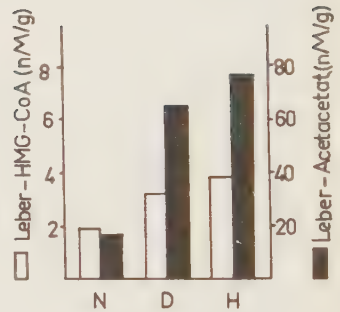
Abb. 2:

VERGLEICH VON HMG-CoA
UND ACETACETAT IN DER
NORMALEN, CHRONISCH
DIABETISCHEN UND
HUNGERNDEN RATTENLEBER

N = Normal

D = Alloxand diabetes

H = Hunger (48 - 76 Std.)



2. Metabolitbestimmungen bei extremer Ketose:

Da bei mäßiger Ketose Veränderungen im Acetyl-CoA-Spiegel der Leber nicht nachzuweisen waren, erschien es aufschlußreich, Stoffwechselsituationen zu untersuchen, die mit extremer Ketose einhergehen. Eine exzessiv gesteigerte Ketonkörperproduktion findet statt in der Leber dekompensierter Diabetesratten oder bei Tieren, die ausschließlich mit Fett ernährt wurden (119, 120). Unter Verzicht auf den Nachweis von HMG-CoA wurde die aktivierte Essigsäure bei solchen Tieren in einem optisch enzymatischen Test mit "condensing enzyme" (90, 94, 120) bestimmt. Der Acetessigsäurespiegel im Blut der schwer ketotischen Ratten war im Durchschnitt auf 16 mg% erhöht.

a. Acetyl-CoA-Bestimmung beim akuten Diabetes:

Alloxandiabetische Ratten, die mit Insulin eingestellt waren, entwickelten nach Absetzen des Insulins eine schwere Blutketose, die durch Cortisongaben noch verstärkt wurde. In der dekompenzierten diabetischen Rattenleber konnte eine beträchtliche Gehaltszunahme an Acetyl-CoA nachgewiesen werden (s. Tab. 2). Gegenüber Kontrolltieren verdoppelte sich der Acetyl-CoA-Gehalt. Diese Befunde unterscheiden sich deutlich von den beim chronischen Diabetes gemessenen Werten.

Tab. 2: DER GEHALT DER RATTENLEBER AN ACETYL-CoA
BEIM AKUTEN DIABETES

Normal Ac-CoA	Akut diabetisch	
	Ac-CoA	Acac
11,2	62,4 a)	40,1
14,7	41,4)	15,3
25,0	68,5 b)	25,4
27,5	51,2 c)	25,4
26,9	51,0)	15,1
10,3	29,5)	6,2
26,4	40,1)	5,5
19,0	28,6)	7,6
27,0	55,6 d)	69,6
10,9	40,7)	4,0
M: 19,9	46,9	21,4
s: 7,45	13,4	

Legende zu Tab. 2, Seite 11:

Die Acetyl-CoA-Werte wurden in nMol pro Gramm Frischleber, die Acetacetatwerte in mg pro 100 ml Blut angegeben. In die Tabelle sind nur Tiere mit einem Blutgehalt von mehr als 4 mg% Acetacetat aufgenommen.

- a) 100 µg Dexamethason 24 Stunden vor Tötung.
- b) 100 µg Dexamethason 48 Stunden und
1 mg Scherisolon 24 Stunden vor Tötung.
- c) 100 µg Dexamethason 72 Stunden, 1 mg Scherisolon
48 und 24 Stunden vor Tötung.
- d) Ohne Cortison.

b. Acetyl-CoA-Bestimmung bei alimentärer Ketose:

Entsprechend den Veränderungen in der Leber dekompenzierter Diabetesratten ließ sich bei ausschließlich mit geräuchertem Schweinespeck ernährten Tieren ebenfalls eine Erhöhung des Acetyl-CoA-Gehaltes feststellen (s. Tab. 3). Auch hier war der auf das Dreifache des Normalwertes angehobene Acetyl-CoA-Spiegel von einer beträchtlichen Blutketose begleitet.

Tab. 3: DER GEHALT DER RATTENLEBER AN ACETYL-CoA
BEI ALIMENTÄRER KETOSE

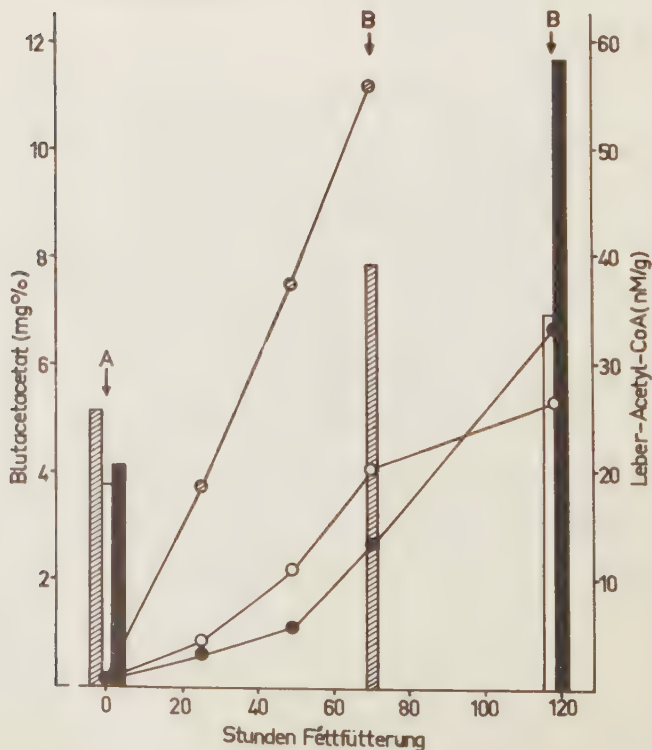
Normal Ac-CoA	Alimentäre Ketose	
	Ac-CoA	Acac
11,2	59,0	7,9
14,7	58,0	10,0
25,0	72,4	12,4
27,5	85,2	7,6
26,9	39,0 (25,5) ^{a)}	11,2
10,3	34,3 (18,7)	5,3
26,4	58,7 (20,5)	6,7
19,0		
27,0		
10,9		
M: 19,9	58,1	8,7
s: 7,45	17,7	

Die Acetyl-CoA-Werte wurden in nMol pro Gramm Frischleber, die Acetacetatwerte in mg pro 100 ml Blut angegeben. Die Kontrolltiere sind die gleichen, die bereits in Tabelle 2 aufgeführt wurden.

a) Die Zahlen in Parenthese bezeichnen die Höhe des Acetyl-CoA-Spiegels in den Lebern der gleichen Tiere von Beginn der Fettfütterung. Vergleiche dazu Abb. 3, S. 14.

Um die Veränderungen des Acetyl-CoA am gleichen Tier aufzuzeigen, wurde bei drei Einzeltieren (s. ^a) Tab. 3 S. 13) je zweimal eine Teilhepatektomie durchgeführt. In der Zeit zwischen den beiden Leberentnahmen wurden die Tiere mit geräuchertem Schweinespeck gefüttert. Gleichzeitig mit der Ausbildung einer schweren Blutketose erhöhte sich der Acetyl-CoA-Gehalt in der Leber auf annähernd 200 % des Ausgangswertes.

Abb. 3: VERGLEICH VON BLUT-ACETACETAT UND LEBER-ACETYL-CoA AM GLEICHEN TIER VOR UND NACH FETTFÜTTERUNG



Legende zu Abb. 3, Seite 14.

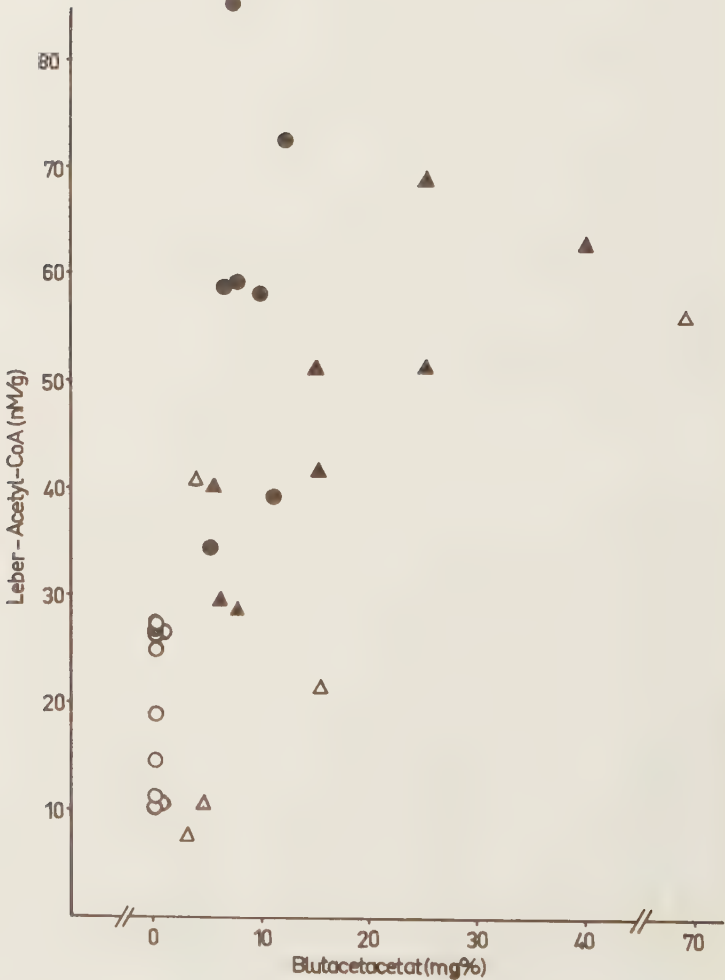
 ● Tier 1;  ○ Tier 2;  ● Tier 3.

Die Säulen bezeichnen den Lebergehalt an Acetyl-CoA,
die Kreise den Blutgehalt an Acetacetat.

Pfeil A = 1. Teilhepatektomie; Pfeil B = 2. Teil-
hepatektomie.

Die angeführten Daten lassen eine direkte Abhängig-
keit von Blutketose und Acetyl-CoA-Gehalt in der
Leber erkennen.

Abb. 4: BEZIEHUNG ZWISCHEN BLUTACETACETATSPIEGEL
UND ACETYL-CoA-GEHALT IN DER RATTENLEBER



○ Normal; ● Fettdiät; ▲ akuter Diabetes;
▲ akuter Diabetes mit Cortison.

In Abb. 4 sind nur die mit "condensing enzyme"
getesteten Proben aufgenommen.

Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit des Acetyl-CoA-Gehalts in der Leber von der Blutketose. Unter extremen Ketosebedingungen ist die stationäre Konzentration von Acetyl-CoA in der Leber beträchtlich erhöht. Dabei ist es gleichgültig, ob die Ketose Ausdruck einer gestörten Stoffwechselregulation oder die Folge einseitiger Fettzufuhr ist. Bemerkenswert erscheint, daß sich eine gesteigerte Ketonkörperproduktion erst bei einem Blutgehalt von mehr als 4 mg% Acetacetat in einem signifikanten Anheben des Acetyl-CoA-Spiegels auswirkt.

B. Papierchromatographische Bestimmung der CoA-Derivate

Neben der quantitativen Bestimmung im optisch-enzymatischen Test wurden verschiedene Verfahren der Papierchromatographie angewandt, um die getesteten CoA-Derivate auch durch direkten Vergleich abzusichern. Mit einer von Stadtman (91) angegebenen Methode wurden freies CoA-SH und CoA-Ester chromatographiert. Auf diesem Wege war jedoch keine befriedigende Trennung zu erreichen, da verschiedene Verunreinigungen des - wenn auch angereicherten Leberextraktes - die Identifizierung beeinträchtigten. Als solche Begleitsubstanzen konnten neben anderen durch vergleichende Chromatographie mit Reinpräparaten

FAD, DPN, DPNH und ATP festgestellt werden. In beträchtlichem Maße waren freies CoA-SH und Acetyl-CoA nachweisbar. Erfolgreicher war die Chromatographie der Acyl-CoA-Derivate entweder als Hydroxamsäuren nach Umsetzung mit Hydroxylamin (100) oder als freie Säuren nach vorhergehender Verseifung (81). Mit den beiden letzten Methoden konnten regelmäßig die Acylgruppe des Acetyl-CoA und bei Verwendung von Kaninchenleberextrakten in etwas geringerer Menge auch die des Propionyl-CoA nachgewiesen werden. HMG-CoA dagegen war in der vorliegenden Menge papierchromatographisch nicht bestimmbar.

DISKUSSION

A. Acetyl-Coenzym A

Beim Diabetes wie auch im Hungerzustand greift der Organismus zur Deckung seines Energiebedarfes vermehrt auf die Oxydation von Fett bzw. Fettsäuren zurück. Wie andere Autoren (4, 55, 89) konnten auch Gordon und Mitarbeiter (33) zeigen, daß bei fastenden oder diabetischen Patienten die nicht veresterten Fettsäuren im Plasma erheblich vermehrt sind. Mit dem erhöhten Angebot im strömenden Blut steigt die Aufnahme an freien Fettsäuren durch die Leber (32). Betrachtet man auf der Basis einer Berechnung von

F. Lynen (66, 112) die energetischen Unterschiede bei der Oxydation von Glykogen und Fett, so ist ein Anstieg der aktivierten Essigsäure zu erwarten, wenn der Körper überwiegend Fett zur Energiegewinnung heranzieht. Um die gleiche Energieausbeute - ausgedrückt in ATP-Äquivalenten - zu erreichen, entsteht im Falle der Fettoxydation im Vergleich zur Glykogenverwertung bis zur Verbrennung im Citronensäurecyclus die 1,6fache Menge an aktivierter Essigsäure (s. Tab. 4).

Tab. 4: UNTERSCHIEDE DER ENERGIEAUSBEUTE BEI DER
OXYDATION VON STÄRKE BZW. VON FETT (nach F.Lynen)

Stärke (Mgew. (162) _n)			Palmito-oleo-stearin (Mgew. 860)		
Ac-CoA	ATP-Äquiv.	ATP-Äquiv.	Ac-CoA	ATP-Äquiv.	ATP-Äquiv.
Mole	verbraucht	gebildet	Mole	verbraucht	gebildet
a) 2	2	16	27	7	123
b) -	-	24	--	-	324
ATP-Netto-Bildung (38 Äquiv.)			440 Äquiv.		
Mole Ac-CoA gebildet bei gleicher ATP-Ausbeute (14 Äquiv.) vor ^{b)}			3,26		

a) vor Eintritt in den Citronensäurecyclus

b) im Citronensäurecyclus

Der Anstieg von Acetacetat in der Leber bei Diabetes oder Hunger kann als Ausdruck dafür gewertet werden, daß unter Ketosebedingungen einem Teil des Acetyl-CoA der Eintritt in den Tricarbonsäurecyclus verwehrt ist. Ein Mangel an Oxalacetat, der dafür verantwortlich gemacht wurde, (56, 113) ließ sich zunächst nicht bestätigen. Löffler (61), Kalnitzky und Tapley (42) und Shaw und Tapley (86) fanden in der Leber chronisch alloxandiabetischer Ratten keine Änderung des Oxalacetatgehalts. Diese Untersuchungen wurden jedoch in einem Diabetesstadium durchgeführt, in dem die Ketose infolge Aufbrauches der Fettvorräte keine hohen Ausmaße aufwies. Neuere Untersuchungen von O. Wieland u. Mitarb. (110, 111), die unter akuten Ketosebedingungen durchgeführt wurden, zeigen einen Abfall des Oxalacetats auf ein Viertel des Normalwertes. Gleichartige Ergebnisse wurden von Th. Bücher und Mitarb. berichtet (9, 40). Zwar sind in ihren Arbeiten keine näheren Angaben über den Ketosegrad der Tiere enthalten, jedoch erlaubt die Ubereinstimmung ihrer Befunde mit denen von O. Wieland et. al. den Schluß, daß auch ihre Untersuchungen im akuten Ketosestadium durchgeführt worden sind. Da beim Fettsäureabbau der Wasserstoff des dabei entstehenden FADH aus thermodynamischen Gründen, im Vergleich zum DPNH, bevorzugt mit dem Sauerstoff reagieren dürfte,

kommt es bei excessiv gesteigerter Fettverbrennung zu einem Elektronenstau im DPN-System der Mitochondrien, d.h. zum Anstieg von reduziertem DPN. Dies bedeutet eine Verschiebung des Redoxpotentials in der Zelle zum Negativen. Das Gleichgewicht der Reaktion Oxalacetat $\rightleftharpoons$ Malat wird auf die Seite des Malats gezwungen. Ähnlich verhalten sich die Redoxpaare Pyruvat $\rightleftharpoons$ Lactat und Dihydroxyacetonphosphat $\rightleftharpoons$ α -Glycerophosphat, wie Bücher et al. (9, 40) bei alloxandiabetischen Ratten und O. Wieland et al. (110, 111) am Perfusionspräparat von Rattenlebern unter Caprylatbelastung fanden.

Durch diese Befunde konnte erstmals eine befriedigende Erklärung für den Abfall des Oxalacetats gegeben werden. Die Verminderung ist also weniger Folge einer gehinderten Bildung, z. B. durch eine Hemmung der Glykolyse (54, 97), sondern - in einer sehr empfindlichen Reaktion - Auswirkung auf eine Änderung des Redoxstatus der Zelle.

Auf Grund der vermehrten Anlieferung einerseits und der gehemmten Verbrennung im Krebscyclus andererseits, war zu erwarten, daß die ketotische Leber einen erhöhten Gehalt an Acetyl-CoA aufweisen würde.

Diese Vorstellung ließ sich unter mäßiger Ketose, wie sie sich beim chronischen Diabetes oder bei nur zwei- bis dreitägigem Nahrungsentzug ent-

wickelt, experimentell nicht bestätigen. Die Einzelwerte zeigen nun, besonders bei den Normaltieren, eine große Schwankung. Dadurch ist es schwer, eine exakte Aussage zu treffen. Eine Erklärung für diese starke Streuung konnte bisher nicht gefunden werden. Jedoch erlaubt die Anzahl der vorliegenden Messungen den Schluß, daß der Acetyl-CoA-Gehalt in der chronisch diabetischen und in der 48 - 76 Stunden hungernden Rattenleber nicht erhöht ist.

Die bei den hier beschriebenen Experimenten verwendeten chronisch alloxandiabetischen Ratten zeigen eine nur mäßige Ketose (siehe auch Diss. Löffler (61)), obgleich die sonstigen diabetischen Kriterien, wie z. B. ein hoher Blutzuckergehalt, eine beträchtliche Polyurie mit Glukosurie sowie eine signifikante Gewichtsabnahme im Verlauf des Diabetes sicher vorhanden waren. Da die Tiere erst nach mindestens vierzehntägigem unkontrolliertem Diabetes zum Versuch kamen, schieden Ratten mit stärkeren Ketosegraden durch Tod im Coma vorzeitig aus. Von zehn nach Alloxaninjektion diabetisch gewordenen Ratten überlebten nur sechs bis sieben die Vierzehntagegrenze. Die gemessene Zunahme des Acetacetats in der Leber um 300 und im Blut um etwa 150 Prozent läßt auf eine nicht übermäßig gesteigerte Fettverbrennung schließen. Tatsächlich erwiesen sich die Ratten zu

diesem Zeitpunkt als extrem fettarm. Durch eine solche Deutung wird auch der an den gleichen Tieren unverändert gefundene Oxalacetatspiegel (61) verständlich, denn wie auf Seite 21 ausgeführt, stellt der Gehalt an Oxalessigsäure eine Meßgröße für die Höhe der Fettsäureoxydation dar.

Für eine konstante Höhe des Acetyl-CoA bei gering erhöhter Ketonkörperproduktion sprechen verschiedene Überlegungen:

Eine Berechnung, wie sie auf Seite 19 angeführt wurde, zeigt die Bildungsrate der "aktivierten Essigsäure", die bei der Verbrennung entweder nur von Glykogen oder nur von Fett auftreten würde. Dieses Entweder - Oder ist aber in vivo nicht möglich. Bereits im Stoffwechsel der normalen Leber stellen die Fettsäuren den Hauptteil der zur Oxydation kommenden Substrate. Dies läßt sich leicht aus folgender Berechnung (30) ersehen: Die menschliche Leber nimmt unter Grundumsatzbedingungen 75 ml Sauerstoff pro Minute auf (22, 74). Annähernd 80 Prozent des Sauerstoffes werden verbraucht für die Oxydation von Fett. Der restliche Sauerstoff dient oxydativen Desaminierungsreaktionen und der Glukoseverbrennung (57, 122). Da unsere Tiere durchwegs nach einem Nahrungsentzug von zwölf Stunden zum Versuch kamen, also unter Bedingungen, wie sie der vorher angeführten Berechnung zugrunde liegen,

könnte dadurch eine Annäherung in der Substratverwertung der normalen an die der chronisch diabetischen Tiere erfolgt sein.

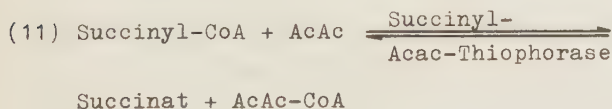
Auffallend beim chronischen Diabetes ist die Beobachtung, daß die in den Weg des Acetyl-CoA zum Acetacetat eingeschalteten Enzyme in ihrer Aktivität beträchtlich gesteigert sind. Die β -Ketoacylthiolase erfährt eine Aktivierung um 17,3 % (115), das Acetacetat synthetisierende Enzymsystem, wie auch das HMG-CoA-kondensierende Enzym, welches in dem Acetacetat bildenden System geschwindigkeitsbestimmend ist (79, 109) um 145 % und die HMG-CoA-Desmolase um 73,5 %. Die Enzymsteigerungen im HMG-CoA-Cyclus könnten für einen beschleunigten Abfluß des Acetyl-CoA verantwortlich sein.

Der erste Schritt der Acetessigsäurebildung, die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA am Enzym β -Ketothiolase, zeigt eine sehr ungünstige Gleichgewichtslage. Folgende Gleichgewichtskonstante wurde gefunden (21):

$$K' = \frac{(\text{Acetacetyl-CoA}) (\text{CoA-SH})}{(\text{Acetyl-CoA})^2} = 1,56 \cdot 10^{-3} \quad (\text{pH } 7,0)$$

Eine Kompensationsmöglichkeit bietet sich der Zelle an durch das ebenfalls intramitochondrial lokalisierte HMG-CoA-kondensierende Enzym (79), welches

das anfallende Acetacetyl-CoA sofort zu HMG-CoA umsetzen kann. Dazu führt die weitere Umwandlung des Acetacetyl-CoA unter einem irreversiblen Verlust der Bindungsenergie der Acyl-Merkaptane zum energiearmen Acetacetat. Bezeichnenderweise war es bei den hier beschriebenen Versuchen nicht möglich, Acetacetyl-CoA im angereicherten Leberextrakt eindeutig nachzuweisen. Das Gleichgewicht der HMG-CoA-Kondensation von Acetacetyl-CoA mit Acetyl-CoA liegt ganz auf der Seite des HMG-CoA. Alle Versuche von Rudney (83, 84), wie auch von Lynen (65), die Reaktion umzukehren, scheiterten. Desgleichen ist der Reaktionsschritt vom HMG-CoA zum Acetacetat praktisch irreversibel (65). Von extremen Substratmangelzuständen abgesehen, gelangt der überwiegende Teil des freigesetzten Acetacetats auf dem Blutweg zu den peripheren Organen, wo seine endgültige Oxydation erfolgt. Dort katalysiert das Enzym Succinyl-Acetacetat-Thiophorase die Aktivierung von Acetacetat durch Übertragung des Coenzym A auf Acetacetat (34, 95) (Gl. 11):



Eine primäre Bedeutung für den gleichbleibenden Acetyl-CoA-Gehalt der Leber bei mäßiger Ketose kann in der Aktivitätssteigerung der Acetacetat bildenden

Enzyme jedoch nicht gesehen werden. Die gleichen Enzyme zeigen beim Hunger keine Veränderung in ihrer Aktivität, trotz einer dem chronischen Alloxandibabetes vergleichbaren Acetacetylatsynthese (61). Setzt man voraus, daß die Substrate normalerweise in Halbsättigungskonzentration vorliegen, wie z.B. das HMG-CoA mit einem durchschnittlichen Gehalt von zwei nMol pro Gramm Frischleber, der in die Größenordnung der von Knappe (46) bestimmten Michaeliskonstanten für Rinderleberdesmolase $K_M = 5,1 \cdot 10^{-6}$ Mol/l zu liegen kommt, so erscheinen diese Enzymaktivitätssteigerungen auch nicht unbedingt notwendig für den raschen Ablauf der Ketonkörperbildung.

In letzter Zeit von O. Wieland u. Mitarb. (110, 111) angestellte Versuche lassen nähere Aussagen über die Abhängigkeit des Acetyl-CoA vom Fettsäureangebot zu. Bei Perfusionsversuchen am Leberpräparat normaler Ratten fand diese Arbeitsgruppe einen ausgeprägten Abfall von Acetyl-CoA, solange der Leber nur Glukose als Brennstoff angeboten wurde und - bei gleichbleibendem Glukosespiegel im Perfusionsmedium - nach Zufuhr von 60 mg Caprylat pro Stunde einen steilen Wiederanstieg. Der Gehalt der Leber an Acetyl-CoA nach Caprylatgabe war jedoch bei keinem der Versuche signifikant höher als der vor Beginn der Durchströmung festgelegte Ausgangswert. Bei

diesen Experimenten ließ sich außerdem nachweisen, daß nahezu das gesamte zugesetzte Cyprylat in Ketonkörper umgewandelt wurde.

Eine experimentelle Bestätigung der unter Ketosebedingungen geforderten Erhöhung des Acetyl-CoA-Spiegels in der Leber ließ sich erst durch Untersuchungen an Tieren mit extremer Ketoacidose erbringen. Alloxandiabetische Ratten, deren Diabetes durch tägliche Insulininjektionen kompensiert ist, entwickeln 24 - 72 Stunden nach Absetzen des Insulins eine schwere Ketoacidose, die durch Cortisongaben noch verstärkt wird. In der dekompensierten diabetischen Rattenleber steigt der Acetyl-CoA-Gehalt auf das Zweifache des Normalwertes an. Gleichartige Befunde lassen sich an Ratten mit alimentärer Ketose erheben. Nach 70 - 120stündiger Ernährung mit geräuchertem Schweinespeck und Wasser ad libitum erhöht sich der Acetyl-CoA-Gehalt in der Leber um 200 %. Die gleichzeitige Kontrolle der Acetessigsäure im Blut läßt eine beträchtliche Ketose erkennen. Diese Befunde stehen im Einklang mit der unter akuten Ketosebedingungen gefundenen Erniedrigung des Oxalacetatspiegels (9, 110, 111). Bei einem Mangel an Oxalacetat nach Anstieg des Quotienten Malat/Oxalacetat entsprechend einer Verschiebung des Redoxpotentials zum Negativen (s. S. 21) wird einem Teil des intermediär anfallenden Acetyl-CoA

der Eintritt in den Citronensäurecyclus verwehrt. Dem Acetyl-CoA bleibt als Ausweichreaktion die vermehrte Bildung von Acetacetat über den HMG-CoA-Cyclus. Unter excessiver Fettverbrennung dürfte der Enzymmechanismus der Ketonkörperbildung nicht mehr für den ungehinderten Abfluß des gesteigerten Acetyl-CoA-Angebotes genügen.

Buehring und Kühnau (10) fanden bei ihren Untersuchungen eine 60%ige Erhöhung des Acetyl-CoA in der alloxandiabetischen Rattenleber. Ihre Angaben über den Schweregrad des Diabetes sind jedoch so unvollständig, daß ein Vergleich mit den hier beschriebenen Versuchen nicht möglich ist. Daneben berichten diese Autoren über einen jahreszeitlichen Rhythmus des Acetyl-CoA-Spiegels. In der Zeit von Januar bis Mai wird ein bemerkenswerter Anstieg angegeben, gegenüber Bestimmungen in der Periode von Juni bis Oktober. Die in vorliegender Arbeit aufgezeigten Versuche wurden alle zwischen Juni und November durchgeführt, weshalb über einen derartigen Saisonrhythmus hier nichts ausgesagt werden kann.

Van Bruggen und Mitarb. (24, 25) fanden in Leberschnitten von diabetischen Ratten einen verringerten Einbau von C^{14} -Acetat in Fettsäuren, Cholesterin und Acetacetat. Dagegen war der Acetat-Einbau in das CO_2 vermehrt. Ihre Beobachtungen ver-

anlaßten sie, für den Diabetes eine erniedrigte Acetyl-CoA-Konzentration zu fordern. Diese Befunde widersprechen in wichtigen Punkten der heute allgemein vertretenen Auffassung vom diabetischen Stoffwechselgeschehen. Die Aktivierung der Acetacetasynthese (61, 86, 110, 111, 120), sowie eine Minderleistung des Citronensäurecyclus (117), neben der auch von ihnen gefundenen Hemmung der Fettsäuresynthese (11, 12, 13, 96, 114, 118, 119) darf wohl als gesichert gelten. Ihre Ergebnisse werden jedoch verständlich, wenn die Untersuchungen an extremen Langzeit-Diabetestieren durchgeführt wurden, deren Fettdepots vollkommen aufgebraucht waren (116, 119). Diese Situation könnte bei ihren Experimenten eingetreten sein, da die Tiere erst nach drei- bis siebenwöchigem Alloxandibabetes zum Versuch herangezogen wurden.

B. β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A

Im Gegensatz zum Verhalten des Acetyl-CoA lassen die Messungen für HMG-CoA beim Langzeit-Diabetes eine signifikante Gehaltszunahme erkennen. Hierbei ergeben sich Unterschiede im Zuwachs des HMG-CoA bei chronisch diabetischen im Vergleich zu hungernden Tieren. Findet sich bei den diabetischen Ratten eine Zunahme im HMG-CoA-Gehalt der Leber um annähernd die Hälfte des Normalwertes, so beträgt sie bei den

Hungertieren nahezu das Doppelte. Die Enzyme der Acetessigsäurebildung erfahren beim Diabetes eine Steigerung ihrer Aktivität. Unverändert bleibt dagegen die HMG-CoA-Reduktase (61), welche die Ausgangsreaktion der Cholesterinsynthese (s. Gl. 10) katalysiert. Ein ganz anderes Verhalten zeigen die genannten Enzyme beim Hunger. In dieser Situation ändern sich die Enzyme des HMG-CoA-Cyclus nicht in ihrer Aktivität (109, 61). Das HMG-CoA-reduzierende Enzym jedoch verschwindet nahezu vollständig aus der Leber von Ratten, die nach längerem Nahrungsentzug zum Versuch kamen (8, 61). Im völligen Ausfall der HMG-CoA-Reduktase einerseits und in der unveränderten Aktivität der Desmolase andererseits könnte der Grund für das unterschiedliche Verhalten von Hunger- und Langzeit-Diabetestier liegen.

Ließen sich für den bei mäßiger Ketose unveränderten Acetyl-CoA-Spiegel Erklärungen finden, so ist der Anstieg von HMG-CoA bei Berücksichtigung dieser Deutungen schwer verständlich. Wie schon erwähnt, ist bei der Acetessigsäuresynthese die HMG-CoA-kondensierende Reaktion geschwindigkeitsbestimmend, die HMG-CoA-Desmolase ist somit im Überschuß vorhanden. Das gebildete HMG-CoA sollte also genügend rasch zu Acetacetat umgesetzt werden können. Eine zusätzliche Steigerung der HMG-CoA-Bildung aus Aminosäuren, wie z.B. aus Leucin (siehe auch S. 4),

wäre möglich, doch dürfte diese Reaktion nur von untergeordneter Bedeutung sein.

Ein der HMG-CoA-Reduktaseaktivität gleichsinniges Verhalten konnte Löffler vom Reaktionsprodukt dieses Enzyms, von der Mevalonsäure aufzeigen (109, 61). In der chronisch diabetischen Leber fand er entsprechend der unveränderten Aktivität des reduzierenden Enzyms einen gleichbleibenden Mevalonsäuregehalt. In der Hungerleber verringerte sich die Mevalonsäure bis unter 20 % des Normalwertes. Da nun der Mevalonsäuregehalt mitbestimmend für die Höhe der Cholesterinsynthese ist (99), wird das Absinken des Serumcholesterins nach länger dauerndem Fasten verständlich (72, 73).

Über das Verhalten der Cholesterinneubildung beim Diabetes liegen bisher sehr unterschiedliche Versuchsergebnisse vor. Hotta und Chaikoff (41) fanden einen erheblich vermehrten Einbau von C^{14} -Acetat in Cholesterin, Wong und Van Bruggen (121) eine Hemmung des Acetateinbaues. Keine Veränderung oder nur eine teilweise Hemmung der Cholesterinsynthese aus Acetat ergaben die Messungen von Haft und Miller (36). Eine ähnliche Beobachtung machten zunächst O. Wieland und I. Neufeldt (114). Bei ihren Untersuchungen mit Gewebeschnitten aus der Leber alloxan-diabetischer Tiere fanden sie keine Änderung des

Acetateinbaues in das Lebercholesterin. Neueste Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe (119) lassen jedoch auch hier analog dem Diabetesstadium eine Differenzierung erkennen. Im akuten Stadium geht die Cholesterinsynthese auf wenige Prozent des Normalwertes zurück. In einem von diesen Autoren postulierten Übergangsstadium - nach längerem Insulinentzug bis zum Auftreten des Langzeitdiabetes - finden sie eine völlige Normalisierung. Im chronischen Stadium konnten sie wieder eine Synthesehemmung auf ein Viertel des Normalwertes feststellen.

Analog zum Verschwinden der HMG-CoA-Reduktase ließ sich in Leberextrakten hungernder Ratten eine Aktivitätsverminderung der am Fettsäureaufbau beteiligten Enzyme nachweisen (78). Besonders ausgeprägt war der Verlust an Acetyl-Carboxylase. Dieses Enzym, welches die einleitende Reaktion der cytoplasmatischen Fettsäurebildung katalysiert (s. auch S. 3), stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Man kann deshalb annehmen, daß die erniedrigte Fettsäuresynthese in der Hungerratte auf einen Mangel an Acetyl-Carboxylase zurückzuführen ist.

Gleichartige Versuche von O. Wieland und Mitarbeiter (118) haben auch beim chronischen Diabetes als Grund für die hier ebenfalls gestörte Fettsäure-

synthese einen Aktivitätsverlust der beteiligten Enzyme erbracht. Die nahezu vollständige Hemmung der Fettsäuresynthese in Leberschnitten von Tieren mit akuter diabetischer Ketose läßt sich nach Untersuchungen von O. Wieland und I. Neufeldt-Eger (119) jedoch nicht auf einen rein enzymatischen Defekt zurückführen.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Tiere und Ketoseerzeugung

1. Chronischer Diabetes:

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten (Sprague - Dawley-Stamm) mit einem Mindestgewicht von 200 g. Die Tiere erhielten ein Standardmischfutter⁺ und wasser ad libitum. Der Diabetes wurde erzeugt durch eine einmalige intravenöse Injektion von Alloxan in 2%iger Lösung. Um toxische Zersetzungsprodukte zu entfernen, wurde das Alloxan einmal aus Wasser umkristallisiert: Eine in Wasser von 37°C gesättigte Lösung von Alloxan (p.a.) wurde über Nacht bei 0°C stehengelassen, wobei sich weiße, nadelförmige Kristalle bildeten. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das kristalline Alloxan mit wenigen Tropfen

⁺) Firma Laatz, Euskirchen/Rhdl., oder Altromin R der Firma Altrogge Laage/Lippe.

eiskalten Wassers auf einen Fritte gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Zur Injektion wurde das gereinigte Präparat in 0,125 m Citrat-Phosphatpuffer pH 4,0 gelöst (44). Durch dieses Vorgehen konnte die diabetogene Dosis (70 mg Alloxan pro kg Ratte bei pH 7,0 (117)) auf 45 mg pro kg Ratte gesenkt werden, wodurch toxische Nebenwirkungen auf Leber- und Nierenparenchym gemildert wurden. Von 10 Ratten entwickelten 3 - 4 einen brauchbaren Diabetes, die restlichen Tiere gingen zum Teil in kurzer Zeit an der toxischen Wirkung des Alloxans zugrunde, zum Teil waren die Tiere unempfindlich gegenüber Alloxan. Bei den diabetisch gewordenen Tieren starben von 10 Ratten 3 - 4 vor Versuchsbeginn im diabetischen Coma. Zur Diabeteskontrolle wurde jeweils nach 12stündigem Fasten Blutzucker (29), Harnzucker (43) und die in 12 Stunden ausgeschiedene Harnmenge bestimmt. Bei den insgesamt 15 untersuchten chronisch diabetischen Ratten betrug der durchschnittliche Nüchternblutzucker 370 mg% (Mindestwert 250 mg%), die mittlere Glucoseausscheidung in 12 Stunden 2,3 g und die Harnmenge 28 ml. Im Mittel nahmen die Tiere im Verlauf ihrer Erkrankung um 26% ihres Ausgangsgewichtes ab. Die geeigneten Tiere wurden nach mindestens fünfzehntägiger unkontrollierter Diabetesdauer im Anschluß an eine zwölfstündige Fastenperiode (über Nacht) zum Versuch herangezogen. Um vergleichbare Ausgangs-

bedingungen zu schaffen, wurden die unbehandelten Kontrolltiere genau so gehalten.

2. Akuter Diabetes:

Im Anschluß an die Alloxaninjektion (wie auf S. 34 beschrieben) erhielten die Tiere täglich zweimal je 2,8 - 3 Einheiten Insulin⁺⁾ . Während der Insulinbehandlung zeigten die Ratten keinerlei Diabetessymptome. Nach Absetzen des Insulins entwickelte sich innerhalb 24 - 72 Stunden das Bild des akut dekompensierten Diabetes mit schwerer Ketoacidose. Als Maßstab für die Ketose diente die Bestimmung der Acetessigsäure im Schwanzvenenblut nach Walker (103). Im Stadium der Dekompensation wurden einem Teil der Versuchstiere ein- bis dreimal je 100 µg Dexamethason oder 1 mg Scherisolon subcutan injiziert. Dadurch konnte eine zusätzliche Stimulierung der Ketonkörperbildung erzielt werden.

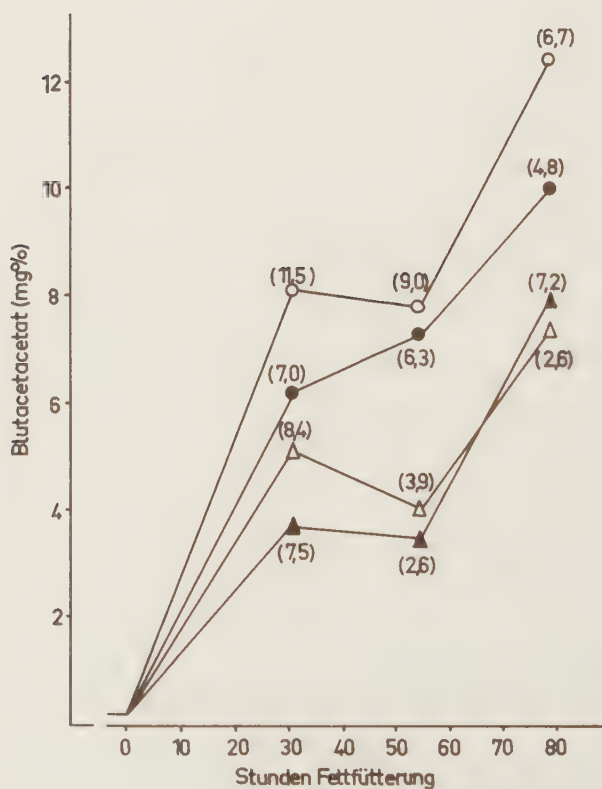
3. Alimentäre Ketose:

Zur Erzeugung alimentärer Ketosen wurden die Ratten mehrere Tage ausschließlich mit geräuchertem Schweinespeck und Wasser ad libitum gefüttert. Durch tägliche Bestimmungen des Acetacetats im Blut wurde die Entwicklung der Ketose kontrolliert.

⁺⁾ Depot-Insulin der Firma Hoechst

Auf dem Höhepunkt der Ketonkörperbildung, der nach etwa 80 Stunden Fettfütterung erreicht war (vgl. Abb. 4), wurden die Tiere zum Versuch verwendet.

Abb. 4: VERHALTEN DER ACETESSIGSÄURE IM BLUT BEI FETTDIÄT



Die Zahlen in Parenthese bezeichnen die aufgenommene Speckmenge in Gramm.

Bei drei Einzeltieren wurde in Äthernarkose durch einen Medianschnitt die Bauchhöhle eröffnet und im Frierstoppverfahren (39) ungefähr 500 mg Lebergewebe entnommen. Nach Ligatur des Leberstumpfes und schichtweisem Verschuß der Laparotomiewunde wurden die Tiere auf Fettdiät gesetzt. 70 bis 118 Stunden nach der ersten Teilhepatektomie hatte sich eine schwere Blutketose ausgebildet (vgl. dazu Abb. 3, S. 14). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Bauchhöhle erneut eröffnet und nochmals ein Stück Leber mit dem Frierstopp abgenommen.

In zwei Blindversuchen wurden die gleichen Operationen ausgeführt. Im Intervall zwischen beiden Teilhepatektomien erhielten die Tiere jedoch Standardmischfutter, wie auf S. 33 beschrieben. Bei diesen Kontrollen konnte keine signifikante Änderung im Acetyl-CoA-Gehalt der Leber nachgewiesen werden (vgl. Tab. 5).

Tab. 5: VERHALTEN VON LEBER-ACETYL-CoA BEI STANDARD-ERNÄHRUNG

	1. Teilhepatektomie	2. Teilhepatektomie
Tier 1	11,2	13,6
Tier 2	10,2	9,4

Alle Werte sind in nMol pro Gramm Frischleber angegeben.

B. Organentnahme und Verarbeitung

In Äthernarkose wurde bei dem Versuchstier die Bauchhöhle eröffnet und die Leber unter Schonung des ernährenden Gefäßsystems freipräpariert. Sodann wurde mit einem Scherenschlag der Gefäßstiel durchtrennt und die Leber sofort in flüssigen Sauerstoff geworfen. Ein späterer Vergleich mit dem Frierstoppverfahren (39) führte zu übereinstimmenden Ergebnissen. Bei Bestimmung der aktivierten Essigsäure mit condensing enzyme wurden etwa 500 mg Leber mit dem Frierstopp entnommen.

Ungefähr 4 g (bzw. 500 mg) der tiefgefrorenen Leber wurden möglichst schnell abgewogen und mit dem dreifachen Volumen 6%iger Perchlorsäure unter Eiskühlung homogenisiert⁺⁾ . Das Homogenisat wurde 10 min bei 20000g und -2°C zentrifugiert, der Rückstand mit der halben Ausgangsmenge 2%iger Perchlorsäure gründlich mechanisch nachextrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden durch tropfenweise Zugabe von 2nKOH an der Glaselektrode vorsichtig auf pH 6,85 eingestellt. Vom unlöslichen Kaliumperchlorat wurde kurz abzentrifugiert. Das klare, schwach gelb gefärbte Filtrat konnte ohne weitere

⁺⁾ Verwendet wurde der Potter-Elvehjem-Homogenisator (80) oder der Ultraturrax TP 18/2 der Firma Janke und Kunkel KG, Staufen i. Br.

Aufarbeitung in den "condensing enzyme-Test" eingesetzt werden.

Zur Bestimmung von HMG-CoA mußten die Extrakte weiter angereichert werden. Die anschließende Extraktion der CoA-Derivate folgte im wesentlichen der Vorschrift von F. Lynen und Mitarb. für die Isolierung der aktivierten Essigsäure aus Hefe (63), einem Verfahren, wie es ursprünglich von O. Warburg für die Isolierung von Nucleotiden ausgearbeitet wurde (104). Hierbei wird dem Filtrat nach Ansäuern mit konzentrierter H_2SO_4 auf pH 3 - 4 festes Ammonsulfat bis zu einer Konzentration von 50 % zugesetzt und von einem zuweilen auftretenden geringen Niederschlag abzentrifugiert. Anschließend extrahiert man im Scheidetrichter⁺⁾ viermal mit je einem Zehntel Volumen Phenolum liquefactum (bezogen auf das Volumen der Ammonsulfatlösung). Die vereinigten phenolischen Extrakte werden durch Ausschütteln mit der halben Menge 0,1 n H_2SO_4 und noch zweimaliges Waschen mit Wasser vom mitgeführten Ammonsulfat befreit und sodann mit dem doppelten Volumen Äther versetzt. Durch insgesamt zehn-

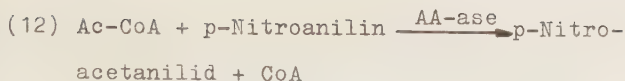
⁺⁾ Zur schnelleren Trennung der einzelnen Phasen wurden die Gemische in einer Scheidetrichterzentrifuge mit einer Beschleunigung von ca. $20 \times g$ zentrifugiert.

häufiges Ausschütteln dieses Phenol-Äthergemisches mit Einzelportionen von 2 ml Wasser werden die gesuchten Derivate aus der phenolischen wieder in die wässrige Phase übergeführt. Mitgeschleppte Spuren von Phenol müssen schließlich durch dreimaliges Ausschütteln der vereinigten wässrigen Extrakte mit einer angemessenen Menge Äther entfernt werden. Die so gewonnenen, durch ihren Flavingehalt stark gelb gefärbten Extrakte werden entweder im Vakuum bei $+ 30^{\circ}\text{C}$ eingeengt oder lyophilisiert. Die Ausbeute an Acetyl-CoA bei der Phenolextraktion beträgt etwa 80 %, wie in Kontrolluntersuchungen festgestellt wurde.

3. Substratbestimmungen:

1. Acetyl-CoA und HMG-CoA im optischen Test mit Arylaminacetylase:

Die Bestimmung von Acetyl-CoA und HMG-CoA in den angereicherten Leberextrakten erfolgte auf optisch-enzymatischem Wege in einem Arbeitsgang. Der Test beruht auf der von Tabor und Mitarb. beschriebenen Methode der enzymatischen Übertragung des Acyl-Restes vom Acetyl-CoA auf p-Nitroanilin durch das Enzym Arylaminacetylase (98) (Gl. 12):



Die Acetylierung des Amins geht mit einer Entfärbung des gelben Farbstoffes einher, die optisch bei 405 nm verfolgt wird. HMG-CoA kann im gleichen Testansatz bestimmt werden, wenn man nach Ablauf der Reaktion A (Gl. 12) HMG-CoA-Desmolase zusetzt, welche neuerdings Acetyl-CoA aus HMG-CoA entbindet (45) (Gl. 13):



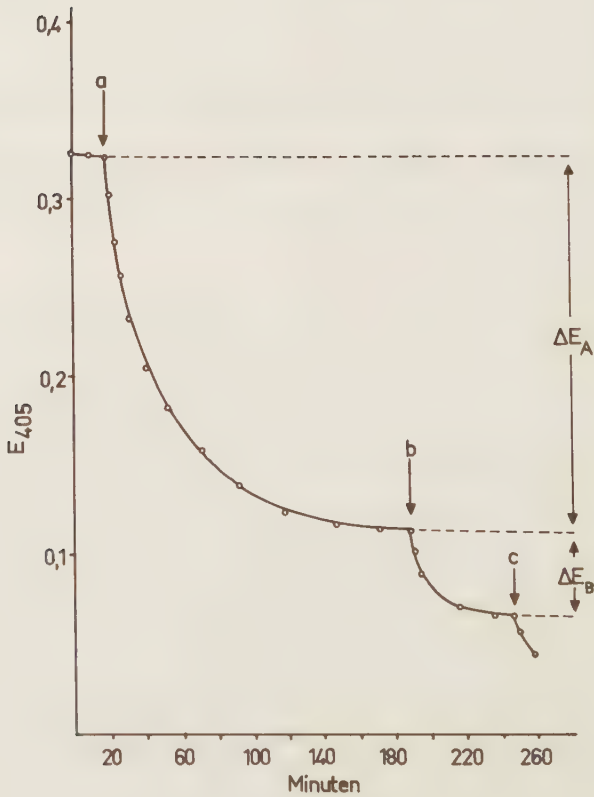
Das durch die HMG-CoA-Spaltung entstehende Acetyl-CoA reagiert nun weiter nach Gl. 12 (Reaktion B).

Abb. 5: KINETIK DER OPTISCH-ENZYMATISCHEN BESTIMMUNG
VON ACETYL-CoA UND HMG-CoA MIT ARYLAMIN-
ACETYLASE

Pfeil a = 100 E Arylaminacetylase;

Pfeil b = 100 E HMG-CoA-Desmolase;

Pfeil c = 50 nM HMG-CoA



Durchführung der Bestimmung von Acetyl-CoA und
HMG-CoA im Test mit Arylaminacetylase:

In eine Cuvette von 10 mm Schichtdicke werden
hintereinander pipettiert:

PNA (bei 18°C gesättigte wässrige Lösung)	0,05 ml
TRIS-Maleatpuffer 0,2 M, pH 6,85 (31)	0,60 ml
GSH 0,2 M	0,02 ml
KOH 0,2 M	0,02 ml

Angereichertes Lebertrockenpulver (vgl.
S. 39), gelöst in TRIS-Maleatpuffer

(diese Menge entspricht einem Einsatz

von ca. 3 g Leber)	1,00 ml
Arylaminacetylase (100 E)	<u>0,02 ml</u>
Endvolumen A	1,71 ml

Nach Stillstand von Reaktion A, die mit
Arylaminacetylase gestartet wurde, werden
zugegeben:

MgCl ₂ 0,5 M	0,02 ml
HMG-CoA-Desmolase (100 E)	<u>0,02 ml</u>
Endvolumen B	1,75 ml

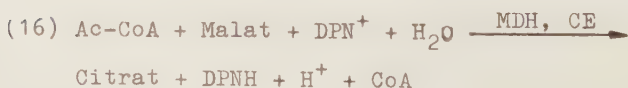
Nach Ablauf von Reaktion B, die nach Zusatz der
HMG-CoA-Desmolase einsetzte, wird durch Zugabe von
50 nM HMG-CoA eine Kontrolle des Testes durchge-
führt. Dabei muß es erneut zu einem Extinktions-

abfall kommen (vgl. auch Abb. 5).

Der Berechnung des gebildeten Paranitroacetanilids aus der Extinktionsabnahme E_A und E_B wurde der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{405} = 10,5 \cdot 10^6$ (cm^2/Mol) für p-Nitroanilin zugrunde gelegt (68). Um die störende Autoxydation von reduziertem Flavin auszuschalten, welche sich in Form einer Extinktionszunahme auswirkte, wurde die Cuvette nach Austreiben gelösten Sauerstoffes mit CO_2 während der ganzen Versuchsdauer geschlossen gehalten. Die Reaktion wurde bei 18°C durchgeführt, die Ablesung erfolgte am Photometer Eppendorf bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Cuvette mit 1,70 ml Puffer und 0,05 ml p-Nitroanilin.

2. Acetyl-CoA im Test mit "condensing enzyme":

In den enteiweißten Leberextrakten wurde Acetyl-CoA durch Kondensation mit Oxalacetat am "condensing enzyme" getestet (120). Als Hilfsreaktion dieser optisch-enzymatischen Bestimmung dient die DPN-abhängige Umwandlung von Malat in Oxalacetat (90, 94) (Gl. 14, 15, 16):



Der Umsatz von Acetyl-CoA kann optisch bei einer Wellenlänge von 366 nm verfolgt werden, gemessen an der Hydrierung von DPN mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von DPNH $\epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6$ (cm^2/Mol) (38).

Durchführung der Bestimmung von Acetyl-CoA im Test mit "condensing enzyme":

In eine Cuvette von 20 mm Schichtdicke (Schmalcuvette) werden hintereinander pipettiert:

TRIS-Puffer 0,5 M, pH 7,0	0,30 ml
K-Malat 0,1 M	0,01 ml
DPN 0,1 M	0,02 ml
Rattenleberextrakt	1,50 ml
(ohne Anreicherung, diese Menge entspricht etwa 300 mg Leber)	
MDH 50 μg	0,01 ml

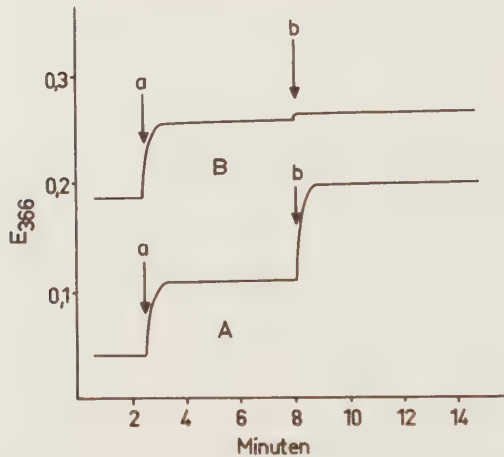
Nach Stillstand der Vorreaktion

Start mit kristallisiertem

condensing enzyme ca. 20 μg	<u>0,01 ml</u>
Endvolumen	1,85 ml

Die Kinetik der Citrat-kondensierenden Reaktion wird mit einem automatischen Schreibgerät zum Photometer Eppendorf unter doppelter Spreizung der Extinktion registriert.

Abb. 6: KINETIK DER OPTISCH ENZYMATISCHEN
BESTIMMUNG VON LEBER-ACETYL-CoA MIT
CONDENSING ENZYME



Pfeil a = 50 µg Malatdehydrogenase, Start der Vor-
reaktion, Einstellen des Gleichgewichtes
Malat / Oxalacetat.

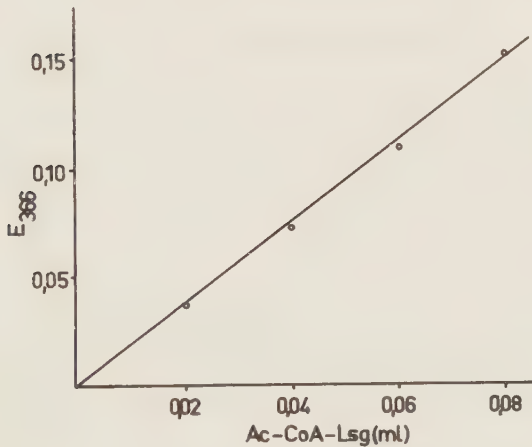
Pfeil b = 20 µg "condensing enzyme", Start der
Citrat-kondensierenden Reaktion.

Figur A Kinetik der Acetyl-CoA-Bestimmung im
Leberextrakt.

Figur B Identische Mengen des gleichen Leber-
extraktes, vor dem Test 30 Minuten bei
pH 13 inkubiert und nach Neutralisation
getestet.

Abbildung 6 läßt erkennen, daß nach alkalischer Hydrolyse des Acetyl-CoA bei Zusatz von Citrat-kondensierendem Enzym keine Reaktion mehr eintritt.

Abb. 7: DPNH-BILDUNG BEI STEIGENDEM EINSATZ VON ACETYL-CoA IM CONDENSING ENZYME-TEST



Zur Leber vor dem Homogenisieren zugesetztes Acetyl-CoA konnte zu 96 % wiedergefunden werden (vgl. Tab. 6).

Tab. 6: WIEDERFINDEN VON ZUGESETZTEM ACETYL-CoA

Acetyl-CoA	Zusatz	berechnet	gefunden	%
24,8	35,8	60,6	59,2	96

Alle Werte sind in nMol angegeben.

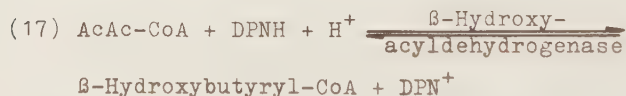
Die mit "condensing enzyme" gefundenen Werte für Acetyl-CoA stimmen überein mit den im Arylamin-acetylase-Test beobachteten.

Tab. 7: VERGLEICHENDE BESTIMMUNG FÜR ACETYL-CoA

Bestimmungsmethode	Ac-CoA nM/ml Extrakt
mit Arylaminacetylase	558
mit Citrat-kondens.-Enzym	550

3. Acetacetyl-CoA:

Die Bestimmung für Acetacetyl-CoA auf optisch-enzymatischem Weg beruht auf folgender Reaktion (19) (Gl. 17):



Testansatz:

$d = 1 \text{ cm}$; $\lambda = 366 \text{ nm}$; $t = 18^\circ\text{C}$.

Na-Pyrophosphat-HCl Puffer 0,02 M, pH 7,3	1,40 ml
DPNH 0,4 M	0,02 ml
Rattenleberextrakt, ca. 1,5 g Leber	
entsprechend (Anreich. s. S. 39)	0,50 ml
β -Hydroxyacyldehydrogenase ca. 50 E	<u>0,02 ml</u>
Endvolumen	1,94 ml

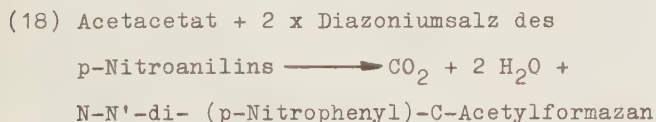
Der Umsatz von Acetacetyl-CoA wird gemessen an der Dehydrierung von DPNH mit Hilfe des molaren Extink-

tionskoeffizienten von DPNH $\epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6$
(cm^2/Mol) (38).

Da in angereicherten Rattenleberextrakten kein sicherer Nachweis für das Vorkommen von Acetacetyl-CoA erbracht werden konnte, wurde der Test nur in zwei Fällen durchgeführt.

4. Kolorimetrische Bestimmung von HMG-CoA:

Neben seiner enzymatischen Bestimmung konnte HMG-CoA nach vorausgehender Spaltung mit HMG-CoA-Desmolase (Gl. 13, S. 41) als Acetacetat kolorimetrisch nach Walker (103) nachgewiesen werden (s. auch Tab. 8, S. 52). Dem Test liegt folgende Reaktion zugrunde: Mit dem Diazoniumsalz des p-Nitroanilins (-Diazoreagens) reagiert die Acetessigsäure unter Bildung eines gelben Farbstoffes, dem N-N'-di- (p-Nitrophenyl)-C-Acetylformazan (Gl. 18):



Der gebildete Farbstoff läßt sich leicht mit Essigsäureäthylester extrahieren. Sein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 440 \text{ nm}$ dient zur kolorimetrischen Bestimmung. Störende Absorptionen anderer Substanzen aus den Phenolextrakten, welche teilweise durch den Essigsäureäthylester mitgelöst werden, verlangen die

Verwendung eines Blindwertes. In diesem wird das HMG-CoA-spaltende Enzym erst nach Ansäuern mit PCS zugesetzt.

Durchführung des Testes:

In zwei Zentrifugengläser A (= Testwert) und B (= Blindwert) werden nacheinander pipettiert:

	Glas A	Glas B
TRIS-Puffer 1,0 M, pH 8,1	1,50 ml	1,50 ml
GSH 0,2 M	0,02 ml	0,02 ml
KOH 0,2 M	0,03 ml	0,03 ml
MgCl ₂ 0,5 M	0,02 ml	0,02 ml
Leberextrakt (Darst. S.39) gelöst in H ₂ O	0,40 ml	0,40 ml
HMG-CoA-Desmolase (100 E)	0,03 ml	--
30' Inkubation bei 30 ⁰ C		
Anschließend Stoppen der Reaktion mit 7 % PCS	2,00 ml	2,00 ml
HMG-CoA-Desmolase (100 E)	--	<u>0,03 ml</u>
Endvolumen	4,00 ml	4,00 ml

Nach kurzem Zentrifugieren der enteiweißten Ansätze werden zur Bestimmung der Acetessigsäure aus den Überständen je 3,5 ml Filtrat in Reagensgläser übergeführt. In der weiteren Verarbeitung wird Probe B wie Probe A behandelt.

Filtrat	3,5 ml
---------	--------

Acetatpuffer 1,4 M, pH 5,2	3,5 ml
----------------------------	--------

Diazoreagens	3,0 ml
--------------	--------

Zur Farbentwicklung 30'

bei 25°C, dann 3' im

Eisbad inkubieren

Zusatz von HCl 5 N	2,0 ml
--------------------	--------

Ausschütteln mit

Essigsäureäthylester	4,0 ml
----------------------	--------

Die Absorption der Essigsäureäthylester-Farblösung wird am Photometer Eppendorf bei einer Wellenlänge von 436 nm in Cuvetten von 1 cm Schichtdicke gemessen. Die Berechnung des Acetacetatgehaltes erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit reiner Acetessigsäure gefunden wurde.

Herstellung des Diazoreagens:

p-Nitroanilin 0,05 % in 0,05 n HCl	20,0 ml
------------------------------------	---------

Na NO ₂ 0,5 %	3,0 ml
--------------------------	--------

Im Eisbad abkühlen lassen,

dann Zusatz von

Na-Acetat 0,2 M	7,0 ml
-----------------	--------

NaNO₂ muß täglich frisch gelöst werden. Das Diazoreagens soll unmittelbar vor seiner Verwendung bereitet werden.

Tab. 8: VERGLEICHENDE BESTIMMUNG VON HMG-CoA IN
nM PRO ml LEBEREXTRAKT

Als Acetyl-CoA (optischer Test)		Als Acetacetat (colorimetrischer Test)
Versuch 1	33,4	34,7
Versuch 2	9,6	9,7

D. Enzymdarstellungen

1. Isolierung der Arylaminacetylase:

Mit geringfügigen Abänderungen wurde die Methode von Tabor und Mitarb. (98) übernommen.

Acetonpulver: Sofort nach Entnahme werden die Lebern von zehn Tauben (Lebergesamtgewicht 75 g) zweimal mit dem zehnfachen Volumen Aceton von -10°C im Starmix 3 Min. homogenisiert. Der Proteinkuchen wird möglichst rasch auf einer Filternutsche abgesaugt und in dünner Schicht bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet. Man erhält etwa 18 g Trockenpulver. Dieses wird bis zur weiteren Verarbeitung im Exsiccator bei $+2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Extraktion: 10 g Trockenpulver werden mit 100 ml chem. reinem Wasser in einer Reibschale unter Eiskühlung sorgfältig verrieben (20 Min.). Das Homogenisat zentrifugiert man 30' mit ca. 20000*g

ab. Der Niederschlag wird nochmals mit 10 ml Wasser nachgewaschen. Die Vereinigung der beiden Überstände ergibt etwa 105 ml Filtrat.

Acetonfraktionierung: Zu 105 ml Rohextrakt wird bis zu einer Sättigung von 42 % im feinen Strahl eisgekühltes Aceton eingerührt. Nach kurzem Abzentrifugieren des ausgefallenen Protein (der Niederschlag wird verworfen) gibt man weiter bis zu einer 77%igen Sättigung Aceton von -15°C zu (Eis/Kochsalzkühlung). Der abzentrifugierte Niederschlag wird nun auf ca. 12 ml mit quarzdestilliertem Wasser M/1000 Trilon aufgenommen.

Geladsorption und Elution: Zur Proteinlösung gibt man zweimal gewaschenes $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel (nach Willstätter, Fa. Schuchardt; 11 mg Trockengewicht/ml). Nach einem Vorversuch wird das Enzym (aus 12 ml Lösung) an 80 ml Gel gebunden. Nach einmaligem Waschen des Gelniederschlags mit 100 ml H_2O kann durch drei- bis viermaliges Eluieren mit Einzelportionen von 30 ml K-Phosphatpuffer 0,01 M, pH 7,85 M/1000 Trilon das Enzym wieder in Lösung gebracht werden.

Ammonsulfatfällung: Zur Konzentrierung des Enzyms wird den vereinigten Eluaten festes, doppelt umkristallisiertes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer 70%igen Sättigung unter Rühren zugesetzt. Der Protein-

Niederschlag wird in wenig quarzdestilliertem Wasser M/1000 Trilon aufgenommen. Bei -15°C aufbewahrt, beträgt die Haltbarkeit mehrere Monate.

Da die solcherart angereicherte Arylamin-acetylase nicht völlig frei von störender Desmolaseaktivität war, wurde die Enzymlösung nach einem Vorschlag von K. Decker (21) durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren einer künstlichen Alterung unterzogen. Durch dieses Vorgehen konnte die Arylaminacetylase vollkommen von aktiver HMG-CoA-Desmolase befreit werden.

Zur Frage der Spezifität der Arylaminacetylase muß gesagt werden, daß nach Messungen von F. Lynen und Mitarbeitern (23) acetylierte Coenzym A - "Bruchstücke", wie Dephospho-CoA, Pantethein usw. von diesem Enzym ebenfalls umgesetzt werden können. Eine geringfügige Affinität zeigt das Enzym auch zum Propionyl-CoA (116). Die Reaktion mit diesem CoA-Ester hat sich jedoch nur bei Kaninchenleberextrakten als störend erwiesen.

Aktivitätsbestimmung der Arylaminacetylase:

d = 1 cm; λ = 405 nm; t = 20° C

PNA (bei 18° C gesättigte Lösung)	0,04 ml
K-Phosphatpuffer 0,2 M, pH 6,8	1,50 ml
Cystein-HCl 1,0 M	0,02 ml
KOH 1,0 M	0,02 ml
Enzymlösung	0,03 ml
DAC (ca. 30 μ M) ⁺⁾	<u>0,05 ml</u>
Endvolumen	1,66 ml

1 EE ist diejenige Enzymmenge, die unter den beschriebenen Testbedingungen in einer Minute eine Extinktionsänderung von 0,001 hervorruft.

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität (EE/mg Protein) wurde der Proteingehalt der Enzymlösung nach der Biuretmethode bestimmt (3).

2. Isolierung der HMG-CoA-Desmolase

Die Enzymanreicherung folgt einer Vorschrift von F. Lynen und Mitarb. (65).

Acetonpulver: 100 g Rinderleber werden mit 1 l auf -15° C abgekühlten Acetons bei +2° C 3 Min. im Starmix homogenisiert. Nach raschem Absaugen des

⁺⁾ Für die Überlassung dieses Präparates möchte ich Herrn Prof. F. Lynen, Max planck-Institut für Zellchemie, München, herzlich danken.

Acetons auf einer großen Filternutsche wird der Proteinkuchen mit wenig Aceton und mit 100 ml peroxydfreiem Ather nachgewaschen. Das noch feuchte Protein läßt man dünn ausgebreitet an der Luft trocknen. 100 g Kinderleber liefern 15 - 20 g Trockenpulver.

Extraktion: 10 g Acetonpulver werden mit 100 ml 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, in Morser unter Eiskühlung sorgfältig verrieben (20 - 30 Min.). Nach 30 Min. Zentrifugieren mit 20000 x g verbleiben 30 ml eines tiefroten Filtrates.

Hitzedenaturierung: Der Rohextrakt wird nach raschem Aufheizen 20 Min. bei 50°C inkubiert, anschließend in einer Eis Kochsalzmischung schnell auf 0°C abgekühlt und mit 80 ml eisgekühltem, quartzdestilliertem Wasser verdünnt. Von denaturiertem Protein abzentrifugiert (45 Min. 20000 x g) resultieren 150 ml einer klaren, roten Lösung.

Acetonfraktionierung: In einem Kältebad von -8°C gibt man unter Rühren auf -15°C vorgeschüttetes Aceton bis zu einer 50 %igen Sättigung zu. Der Niederschlag wird bei -8°C abzentrifugiert und verworfen. Dem Überstand wird weiter bis zu einer Sättigung von 70 % Aceton von -15°C zugesetzt. Durch eine Eis Kochsalzkühlung kann ein Temperaturanstieg über -10°C in der Proteinlösung vermieden

werden. Die Fällung wird bei -10°C abzentrifugiert und das Präzipitat in 40 ml 0,05 M TRIS-Puffer, pH 7,5, aufgenommen. Es entsteht häufig eine trübe, rötliche Lösung, die aber nicht abzentrifugiert werden muß.

Zinkfällung: Langsam, unter stetigem Rühren werden 40 ml dieser Lösung mit 10 ml 0,1 M Zinkacetat versetzt (Eiskühlung). Das Filtrat aus zehnminütigem Zentrifugieren bei 20000 g und die erste Wäsche des Niederschlages mit 10 ml 0,05 M TRIS-Puffer, pH 7,5, werden verworfen. Jetzt wird der Niederschlag mit 20 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, gründlich aufgerührt - es sollen keine Zinkproteinpartikel mehr sichtbar sein. Aus dieser Suspension werden nach hochtourigem Zentrifugieren 20 ml einer hellroten Lösung gewonnen.

Ammonsulfatfällung: Zu dieser Proteinlösung läßt man im Eisbad das gleiche Volumen einer bei 0°C gesättigten Ammonsulfatlösung (hergestellt aus doppelt umkristallisierten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) langsam zutropfen. Nach 10 Min. Stehen im Eisbad wird das gefällte Protein 15 Min. mit 20000*g abzentrifugiert. Den geringen weißen Niederschlag nimmt man in einer angemessenen Menge 0,05 M TRIS-Puffer, pH 7,5, auf. Die Lösung ist schwach gelb gefärbt.

Da die HMG-CoA-Desmolase gegen häufiges Auftauen und Wiedereinfrieren besonders anfällig ist (20), schien es günstig, die Enzymlösung in kleineren Einzelportionen einzufrieren und diese nacheinander aufzubrauchen.

Aktivitätsbestimmung der HMG-CoA-Desmolase:

$d = 1 \text{ cm}$; $\lambda = 405 \text{ nm}$; $t = 20^{\circ}\text{C}$

PNA (bei 18°C gesättigte wässrige Lösung)	0,04 ml
TRIS-Puffer 1 M, pH 8,1	1,00 ml
MgCl ₂ 0,1 M	0,20 ml
K-Thioglykolat 1 M	0,02 ml
HMG-CoA (ca. 0,05 M)	0,05 ml
Arylaminacetylase 50 E	0,01 ml
H ₂ O	0,47 ml
Desmolasefraktion	<u>0,01 ml</u>
Endvolumen	1,80 ml

Als EE wird diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Testbedingungen die Extinktionsänderung 0,001 von der 3. bis zur 8. Min. nach Desmolasezugabe bewirkt. Spez. Aktivität = EE/mg Protein.

E. Papierchromatographische Bestimmung von CoA-SH
und CoA-Derivaten:

1. Chromatographie als freies Coenzym A und als
CoA-Ester:

Es wurde die von Stadtman (91) beschriebene
Methode gewählt.

Auf 3 cm breiten und 40 cm langen Filterpapier-
streifen werden in einer scharfen Front über etwa
2 cm hinweg neben dem Phenolextrakt (enthaltend
5 nM Acetyl-CoA, bestimmt mit der Arylaminacetylase)
5 - 10 nM folgender Vergleichslösung aufgetragen und
aufsteigend chromatographiert:

CoA-SH, Ac-CoA, Prop-CoA, AcAc-CoA, HMG-CoA, FAD,
DPN, DPNH und ATP.

Fließmittel: Äthanol: 0,1 M Acetatpuffer, pH 4,5 (1:1)

Papier: Schl. % Sch. 2043 b Mgl.

Temperatur: + 2°C

Zeit: ca. 25 Stunden

Nach dem Trocknen der Papierstreifen werden die
RF-Werte der einzelnen Substanzen im UV-Licht
und, soweit es sich um CoA-SH oder CoA-Ester handelt,
zusätzlich durch die Nitroprussidnatriumreaktion (93),
einer Modifikation der Methode von Grunert und Philips
(35), festgelegt. Disulfide geben erst nach Besprühen
mit einer starken Cyanidlösung (Gl. 19) eine Rot-
färbung im Nitroprussidtest.



Ausführung der Nitroprussiatreaktion:

Die getrockneten Papierstreifen werden mit einer Lösung folgender Zusammensetzung besprüht:

1,5 g Nitroprussidnatrium werden in 5 ml 2 M H_2SO_4 gelöst. Dazu gibt man 95 ml Methanol und 10 ml konzentrierten Ammoniak; von einem weißen Niederschlag wird abzentrifugiert. Treten sofort nach dem Besprühen rote Flecken auf, so handelt es sich um freie SH-Gruppen. Acyl-Merkaptane geben nach einer darauf folgenden Behandlung mit alkoholischer Natronlauge (2 g NaOH + 5 ml H_2O + 95 ml Methanol) oder durch Einbringen der Papierstreifen in Ammoniakdämpfe (verzögerte Nitroprussidreaktion (70)) ebenfalls in Kürze eine Rotfärbung. Beide Farbreaktionen lassen sich durch Eintauchen in Äther verstärken.

RF-Werte:	Ac-CoA	0,75
	Prop-CoA	0,55

Ein sehr empfindlicher Farbnachweis auf reduzierende Substanzen (jedoch nicht spezifisch auf SH-Gruppen) konnte durch Anwendung der sog. "Berliner Blau"-Reaktion gefunden werden. Es war mit dieser Methode möglich, noch $0,2 \text{ nMol Acetyl-CoA/cm}^2$ auf dem Papier nachzuweisen.

Rotes Blutlaugensalz $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ wird bei Reduktion in gelbes Blutlaugensalz $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_4$ übergeführt. Das Ferrosalz läßt sich nun leicht mit Ferrisalzen unter Bildung eines blauen Farbkomplexes (Berliner Blau) bestimmen (Gl. 20):



Reagentien:

- 1) Eine gesättigte Lösung von $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ in 85 %igem Alkohol (vom ungelösten Salz wird dekantiert).
- 2) 1 g FeCl_3 gelöst in 100 ml salzsaurem 80 %igem Alkohol (80 ml Äthanol + 20 ml 2nHCl).

Es wird folgendermaßen vorgegangen:

- 1) Der getrocknete Papierstreifen wird mit der Kaliumferricyanidlösung besprüht.
- 2) Anschließend kurzes Einbringen in Ammoniakdämpfe zur Freisetzung der SH-Gruppen aus den Thiolethern.
- 3) Besprühen mit der sauren FeCl_3 -Lösung. Die Farbentwicklung läßt sich durch Hitze beschleunigen (Trockenschrank 80-100°C, ca. 1 Min.)

Reduzierende Substanzen erscheinen bei der Anfärbung in einem deutlichen Blau (beständig); der Hintergrund des Papiers nimmt einen hellen, gelbgrünen Farbton an.

2. Chromatographie der CoA-Ester als Hydroxamsäuren
nach Umsetzung mit Hydroxylamin:

Herstellung einer salzfreien, alkoholischen Hydroxylaminlösung (20):

- 1) 10 g Hydroxylaminhydrochlorid werden mit 60 ml Methanol am Rückflußkühler gekocht (das Hydroxylamin löst sich nach etwa 20 Min.).
 - 2) 3,65 g läßt man in 60 ml 99 %igem Alkohol unter N_2 abkühlen. Das sich bildende K-Alkoholat dient in 3) der Ausfällung von Kaliumchlorid.
 - 3) 2) läßt man langsam in 1) tropfen und saugt dann auf einer Nutsche vom ausgefallenen Salz ab.
- Es resultieren 100 ml einer 1 M, alkoholischen Hydroxylaminlösung.

Umsetzung des Phenolextraktes mit Hydroxylamin:

0,6 ml Phenolextrakt (Herstellung s.S. 39, nach enzymatischem Test mit einem Gehalt von 170 nM Ac-CoA und 30 nM HMG-CoA) werden mit 1 ml 1 M alkoholischer Hydroxylaminlösung 30' bei 50°C inkubiert. Nach Zusatz von 5 ml Äthanol wird kurz abzentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 1 ml im Vakuum bei 20°C eingeengt. Die verbleibende Lösung wird mit wenig 2 N HCl auf pH 4 eingestellt und im Vakuum völlig zur Trockne gebracht. Den hauptsächlich aus Salzen bestehenden Rückstand extrahiert man dreimal mit je 1 ml absolutem Alkohol und dampft erneut bis zur Trockne ein. Zuletzt wird

der Trockenrückstand zweimal mit je 0,2 ml n-Butanol gut aufgerieben, scharf zentrifugiert und die erhaltene Lösung aufsteigend nach Thompson (100) chromatographiert.

Fließmittel: n-Butanol gesättigt mit 3 N Ammoniumhydroxyd

Sättigungsmittel: 3 N Ammoniumhydroxyd gesättigt mit n-Butanol. Vor dem Einfüllen des Fließmittels in den dafür vorgesehenen Trog werden die Papierstreifen 30 Min. der Atmosphäre über dem Sättigungsmittel im Chromatographiegefäß ausgesetzt.

Papier: Schl. & Sch. 2043b Mgl 3 x 40 cm

Temperatur: 20°C

Zeit: 20 - 30 Stunden

Die Festlegung der Hydroxamsäuren auf dem Chromatogramm erfolgt durch Aufsprühen von 5 %igem (w/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in salzsaurer, alkoholischer Lösung (10 ml 2 n HCl + 90 ml Athanol) (59). Hydroxamsäuren färben sich bei dieser Prozedur rotbraun bis violett an. Die einzelnen Säuren werden durch vergleichende Chromatographie mit Reinsubstanzen - Acetyl-Hydroxamat, Propionyl-Hydroxamat und der Hydroxamsäure der β -Hydroxy- β -Methyl-Glutarsäure - identifiziert.

RF-Werte:	Ac-CoA	0,47
	Prop-CoA	0,61

3. Chromatographie der CoA-Ester als freie Säuren nach alkalischer Hydrolyse:

Die Chromatographie der Carbonsäuren erfolgt aufsteigend in Form ihrer Ammoniumsalze (81).

Zu deren Herstellung wird auf folgende Weise vorgegangen:

Phenolextrakt mit einem Gehalt von etwa 200 nM Acetyl-CoA (mit der Arylaminacetylase getestet) wird mit H_2O auf 5 ml verdünnt. Dazu werden 5 ml Äthanol gegeben und das Gemisch bei pH 4 - 5 dreimal mit je 5 ml Petroläther (bei 40 - 60° siedend) ausgeschüttelt. Dann stellt man die alkoholisch-wässrige Lösung mit wenig 10 N KOH auf pH 12 - 13 ein und inkubiert 30 Min. bei 37°C. Nach Wiederansäuern auf pH 4 wird erneut mit Petroläther ausgeschüttelt, bis die ätherische Phase neutral wird. Die vereinigten Petrolätherwäschen schüttelt man nun mit 1 - 2 ml konzentriertem Ammoniak aus. Dabei entstehen die Ammoniumsalze der Carbonsäuren, die sich in der wässrigen der ätherischen Phase unterschichten. Die abgelassene wässrige Lösung wird zur Chromatographie noch etwas eingengt.

Unmittelbar vor dem Gebrauch werden die Filterpapierstreifen etwa eine Stunde einer konzentrierten Ammoniakatmosphäre ausgesetzt.

Fließmittel: n-Butanol gesättigt mit 1,5 N
Ammoniumhydroxyd
Sättigungsmittel: 1,5 N Ammoniumhydroxyd gesättigt
mit n-Butanol
Papier: Schl. & Sch. 2043b Mgl 3 x 40 cm
Temperatur: 20°C
Zeit: 18 - 20 Stunden

Nach dem Lufttrocknen wird das Chromatogramm mit einer 0,04 %igen (w/v) Bromkresolpurpurlösung in 1 : 5 (v/v) Formaldehyd : Äthanol besprüht. Bringt man die Papierstreifen in eine Atmosphäre, gesättigt mit einer 3 %igen Ammoniaklösung (mit kurzen Intervallen insgesamt 1 - 2 Min.), so treten die Fettsäuren als kräftige gelbe Flecke auf einem blauroten Hintergrund hervor.

Die Identifizierung erfolgt auch hier durch vergleichende Chromatographie mit Reinsubstanzen, die durch einfache Salzbildung der bidestillierten Fettsäuren mit konzentriertem Ammoniak erhalten werden.

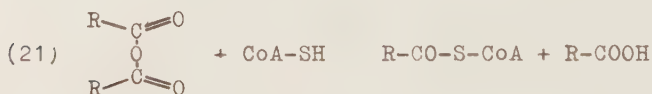
RF-Werte:	Ac-CoA	C,11
	Prop-CoA	0,26

Reagentien:

DPN, DPNH und ATP wurden von der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim, bezogen. CoA-SH (ein 50 - 60 %iges

Präparat) aus Hefe stellte freundlicherweise Dr. Bergmeier, Tutzing, zur Verfügung. MDH (1) und B-HAD (69) wurden aus Schweineherzen, Arylamin-acetylase aus Taubenleber (98) und HMG-CoA-Desmolase aus Rinderleber (65) isoliert. Citrat-kondensierendes Enzym wurde von Dr. G. Löffler zur Verfügung gestellt⁺).

Acetyl-CoA wurde nach Angaben von Simon und Shemin (87) durch Umsetzung von CoA-SH mit Essigsäureanhydrid synthetisiert, HMG-CoA in entsprechender Weise aus CoA-SH und HMG-Anhydrid⁺⁺) (37) (Gl. 21):



Umsetzung:

Eine Lösung von CoA-SH wird bei pH 8 - 9 im Eisbad 30 Min. mit H₂S durchströmt (Nachstellen des pH mit KOH ist erforderlich). Nach Ansäuern mit 2 N HCl auf pH 3 - 4 wird überschüssiges H₂S im Stickstoffstrom ausgetrieben. Dann wird die Lösung mit

⁺) Herrn Dr. G. Löffler, z.Zt. Poliklinik der Universität Homburg/Saar und

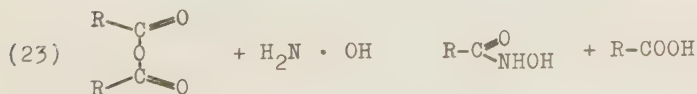
⁺⁺) Herrn Privatdozenten Dr. W. Lamprecht, Technische Hochschule München, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung der genannten Substanzen meinen herzlichen Dank sagen.

KOH auf ein pH von 7,5 gebracht und durch Zugabe einer KH_2CO_3 -Lösung gepuffert. Unter ständigem Durchperlen von Stickstoff zur Vermeidung einer Reoxydation inkubiert man mit einem 10 - 20 %igen Überschuß des Anhydrids. Die Beendigung der Umsetzung kann durch das Verschwinden der Nitroprussidreaktion (35) in einer kleinen Probe durch Tüpfeln nachgewiesen werden. Jetzt wird auf pH 5,5 angesäuert und überschüssiges Anhydrid durch Ausschütteln mit Äther entfernt.

Acetacetyl-CoA ließ sich unter Bedingungen der Methodik von Shemin durch Umsetzen von CoA-SH mit Diketen (18), dem inneren Anhydrid der Acetessigsäure herstellen (Gl. 22). Die Umsetzung läuft bei einem geringen Überschuß an Diketen quantitativ ab.



Die Test-Hydroxamsäuren für die Papierchromatographie wurden von den Säureanhydriden oder Fettsäure-Äthyl-Estern ausgehend durch Umsetzung mit dem zehn- bis zwanzigfachen Überschuß einer salzfreien alkoholischen Hydroxylaminlösung (Herstell. s. S. 62) synthetisiert. (Gl. 23, 24):





Nach einer Inkubation von 30 Min. bei 50°C wird angesäuert und dann bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird gut mit absolutem, warmem Alkohol extrahiert. Schließlich werden aus dem klaren, alkoholischen Filtrat (kurz zentrifugiert) die Hydroxamsäuren umkristallisiert.

Statistische Berechnung:

Die Standardabweichung s wurde unter Zugrundelegung der Streuung s^2 errechnet. Dabei ist

$$s^2 = \frac{(S(x^2) - \bar{X}S(x))}{N-1} \quad S(x^2) = \text{Summe der ins Quadrat erhobenen Einzelwerte}$$

$$s = \sqrt{s^2} \quad \bar{X} = \text{Arithmetischer Mittelwert}$$

$S(x)$ = Summe der Einzelwerte

N = Anzahl der Einzelwerte

Die statistische Berechnung der Signifikanz erfolgte nach der t-Verteilung. Diese wird mit Hilfe der Standardabweichung der Mittelwertsdifferenz zweier Reihen errechnet:

$$s_{x,x'}^2 = \frac{S(x^2) - \bar{X}S(x) + S(x'^2) - \bar{X}'S(x')}{N + N' - 2}$$

$$s_D = \sqrt{\frac{s_{x,x'}^2}{N} + \frac{s_{x,x'}^2}{N'}}$$

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{x}'}{s_D}$$

Die Wahrscheinlichkeit P wurde den "Statistical Tables for Agricultural, Biological and Medical Research" von R.A. Fisher und F. Yates, Edinburg: Oliver and Boyd, 1953, entnommen. (Vgl. auch "Wissenschaftliche Tabellen Geigy", S.26).

ZUSAMMENFASSUNG

1. In vorliegender Arbeit wurde in den Lebern normaler und ketotischer Ratten das Verhalten von Acetyl-Coenzym A und β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A untersucht.
2. Es konnte gezeigt werden, daß bei mäßiger Ketose, wie sie sich beim Langzeit-Diabetes oder nach zwei- bis dreitägigem Nahrungs-entzug einstellt, der Spiegel der aktivierten Essigsäure unverändert ist. Für HMG-CoA fand sich unter diesen Bedingungen eine signifikante Erhöhung.
3. Unter extremen Ketosebedingungen - beim akuten Diabetes und bei der alimentären Ketose - konnte eine beträchtliche Gehaltszunahme der Leber an Acetyl-Coenzym A nachgewiesen werden.
4. Durch verschiedene Methoden der Papierchromatographie war es möglich, einen qualitativen Nachweis der getesteten Coenzym A-Derivate zu erbringen.
5. Die gewonnenen Ergebnisse wurden im Rahmen des Ketose-Stoffwechsels diskutiert.

An dieser Stelle möchte ich meinem Lehrer,
Herrn Prof. Dr. O. Wieland, II. Medizinische Klinik
der Universität München, für die Überlassung des
Themas und für die unermüdliche Unterstützung der
Arbeit, meinen besten Dank sagen.

Für die großzügige Gewährung eines Stipendiums, welches
mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat, danke
ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

LITERATUR:

1. Athenstädt, R.: Diplomarbeit, München 1956
2. Bachawat, B.K., Robinson, W.G. and Coon, M.J.:
J. Biol. Chem. 216, 727 (1955)
3. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th.,
Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und
Pfleiderer, G.: Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
4. Bierman, E.L., Dole, V.P. and Roberts, T.N.:
Diabetes 6, 475 (1957)
5. Bloch, K., Clark, C. and Harary, J.:
J. Biol. Chem. 211, 687 (1954)
6. Brady, R.O.: Proc. nat. acad. Sci. (Wash.)
44, 993 (1958)
7. Buchanan, J.M., Sakami, W., Gurin, S., Wilson,
D.W.: J. Biol. Chem. 157, 747 (1945)
8. Bucher, N.L.R., Overath, P., and Lynen, F.:
Fed. Proc. 18, 20 (1959)
9. Bücher, Th. und Klingenberg, M.:
Angew. Chem. 70, 552 (1958)
10. Buehring, H. und Kühnau, J.:
Klin. Wo. 38, 694 (1960)
11. Chaikoff, I.L.: Harvey-Lectures 1951-1952
47, 99 (1953)
12. Chernik, S.S. and Chaikoff, I.L.:
J. Biol. Chem. 186, 539 (1950)
13. Chernik, S.S. and Chaikoff, I.L.:
J. Biol. Chem. 188, 389 (1951)
14. Dakin, H.D.: J. Biol. Chem. 5, 173 (1908)
15. Dakin, H.D.: J. Biol. Chem. 5, 303 (1908)
16. Dakin, H.D.: J. Biol. Chem. 6, 203 (1909)
17. Dakin, H.D.: J. Biol. Chem. 6, 221 (1909)
18. Decker, K. und Lynen, F.:
3. Congr. Intern. Biochim.,
Comm. 36, Brüssel 1955

19. Decker, K.: Dissertation, München 1955
20. Decker, K.: Privatmitteilung
21. Decker, K.: Die aktivierte Essigsäure, S. 189
Stuttgart: Ferdinand Enke-Verlag
1959
22. Drabkin, D.L.: J. Biol. Chem. 182, 317 (1950)
23. Eggerer, H.: Diplomarbeit, München 1956
24. Ellwood, J.C., and van Bruggen, J.T.:
J. Biol. Chem. 235, 568 (1960)
25. Ellwood, J.C., Marcó, A. and van Bruggen, J.T.:
J. Biol. Chem. 235, 573 (1960)
26. Emden, G., Salomon, H. und Schmidt, F.:
Beitr. Chem. Physiol. Path.
8, 129 (1906)
27. Emden, G. und Marx, A.:
Beitr. Chem. Physiol. Path.
11, 318 (1908)
28. Ferguson, J.J.jr., Durr, J.F. and Rudney, H.:
Proc. nat. acad. Sci. (Wash.)
45, 499 (1959)
29. Frank, H. und Kichberger, E.:
Bioch. Z. 320, 359 (1950); vgl.
auch Anleitung für das Photo-
meter-Eppendorf: Bestimmung
der wahren Glucose
30. Fritz, I.B.: Phys. Reviews 41, 75 (1961)
31. Gomori, G.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)
68, 354 (1948) - Methods in
Enzymology Band 1, S. 144.
New York: Academic Press 1955
32. Gordon, R.S.jr.: J. Clin. Invest. 36, 810 (1957)
33. Gordon, R.S.jr. and Cherkes, A.J.:
J. Clin. Invest. 35, 206 (1956)
34. Green, D.E., Goldmann, D.S., Mii, S., und
Beinert, H.: J. Biol. Chem. 202, 137 (1953)
35. Grunert R. and Philips, P.:
Arch. of Biochem. and Biophysics
30, 217 (1951)

36. Haft, D.E. and Miller, L.L.:
Amer. J. Phys. 192, 33 (1958)
37. Hilz, H., Knappe, R., Ringelmann, E. und Lynen,
F.:
Biochem. Z. 329, 476 (1958)
38. Hohorst, J.J.:
Biochem. Z. 328, 509 (1957)
39. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H. und Bücher, Th.:
Biochem. Z. 332, 18 (1959)
40. Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., Reim, M. und
Hübener, H.J.:
Biochem. Biophys. Res. Comm.
4, 163 (1961)
41. Hotta, S. and Chaikoff, I.L.:
J. Biol. Chem. 198, 895 (1952)
42. Kainitzky, G. and Tapley, D.F.:
Bioch. J. 70, 28 (1958)
43. Keilin, D. and Hartree, E.F.:
Bioch. J. 39, 293 (1945); Genaue
vgl. Information der Biochemica
Boehringer: Enzymatische
Bestimmung der Glucose
44. Klebanoff, F.J. and Greenbaum, A.L.:
J. Endocrin. 11, 314 (1959)
45. Knappe, J.:
Diplomarbeit, Universität
München 1956
46. Knappe, J.:
Dissertation, Universität
München 1957
47. Knappe, J., Ringelmann, E. und Lynen, F.:
Biochem. Z. 335, 168 (1961)
48. Knappe, J., Schlegel, H.G. und Lynen, F.:
Biochem. Z. 335, 101 (1961)
49. Knappe, J., Ringelmann, E. und Lynen, F.:
Bioch. Z. 332, 195 (1959)
50. Knoop, F.:
Oxydation im Tierkörper,
Ferdinand Enke-Verlag,
Stuttgart 1931
51. Knoop, F.:
Beitr. Chem. Physiol. Path.
6, 150 (1904)
52. Krebs, H.A. and Johnson, W.A.:
Adv. Enzymol. 3, 191 (1943)

53. Krebs, H.A. and Johnson, W.A.:
Enzymologia 4, 148 (1937)
54. Lamprecht, W. und Trautschold, I.:
Hoppe-Seyler's Z. f. physiol.
Chemie 311, 145 (1958)
55. Laurell, S.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest.
8, 81 (1956)
56. Lehninger, A.L.: J. Biol. Chem. 164, 291 (1946)
57. Levine, R. and Fritz, I.B.:
Diabetes 5, 209 (1956)
58. Lipman, F.: Harvey Lect. 44, 99 (1948/49)
59. Lipman, F. and Tuttle, L.C.:
J. Biol. Chem. 159, 21 (1945)
60. Lipman, F.: J. Biol. Chem. 160, 173 (1945)
61. Löffler, G.: Dissertation, Universität
München 1961
62. Lynen, F.: Liebigs Ann. 552, 270 (1942)
63. Lynen, F., Reichert, E. und Rueff, L.:
Liebigs Ann. 578, 1 (1951)
64. Lynen, F., Wessely, L., Wieland, O. und Rueff, L.:
Angew. Chem. 64, 687 (1952)
65. Lynen, F., Henning, U., Bublitz, C., Sörbo,
B. und Kröplin-Rueff, L.:
Biochem. Z. 330, 269 (1958)
66. Lynen, F.: Angew. Chem. 67, 463 (1955)
67. Lynen, F.: J. cell. comp. Physiol. 54,
Suppl. 1, 33 (1959)
68. Lynen, F. und Reinwein, D.:
Unveröffentlicht
69. Lynen, F. und Wieland, O.:
Methods in Enzymology Vol. 1,
p. 566, Edit.: Colowick, S.P.
and Kaplan, N.O., Acad. Press.
Inc. Publ., New York 1955
70. Lynen, F.: Liebigs Ann. 574, 33 (1951)

71. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jütting, G.,
Ringelmann, E. und Lachance, J. P.:
Biochem. Z. 335, 123 (1961)
72. Man, E.B. and Gildea, E.F.:
J. Clin. Invest. 15, 203 (1936)
73. Mann, G.V. and White, H.S.:
Metabolism 2, 47 (1953)
74. Myers, J.D.:
J. Clin. Invest. 29, 1421
(1950)
75. Nachmansohn, D. und Machander, A.L.:
J. Neurophys. 6, 397 (1943)
76. Nachmansohn, D. und Berman, M.:
J. Biol. Chem. 165, 551 (1946)
77. Novelli, G.D. und Lipman, F.:
J. Biol. Chem. 182, 213 (1950)
78. Numa, S., Matsuhachi, M. und Lynen, F.:
Bioch. Z. 334, 203 (1961)
79. Overath, P.:
Diplomarbeit, Universität
München 1960
80. Potter, V.R.:
Methods in Enzymology I, S. 10
New York, Acad. Press. 1955
81. Reid, R.L. and Lederer, M.:
Biochem. J. 50, 60 (1952)
82. Rittenberg, D. und Bioch. K.:
J. Biol. Chem. 157, 749 (1945)
83. Rudney, H.R. and Ferguson, J.J. jr.:
J. Biol. Chem. 234, 5 (1959)
84. Rudney, H.R. and Ferguson, J.J.:
J. Amer. chem. Soc. 79,
5580 (1957)
85. Seubert, W., Greull, G. und Lynen, F.:
Angew. Chem. 69, 359 (1957)
86. Schaw, W.V. and Tapley, D.F.:
Biochem. Biophys. Acta 30,
426 (1958)
87. Simon, E.J. and Shemin, D.:
J. Amer. chem. Soc. 75, 2520
(1953)
88. Sodak, M. and Lipman, F.:
J. Biol. Chem. 175, 999 (1948)

89. Schrade, W., Böhle, E., Biegler, R. und Kirst, H.;
Münchn. med. Wschr. 101, 2062
(1959)
90. Stern, J.R., Shapiro, B., Stadtman, E.R. and Ochoa, S.:
J. Biol. Chem. 193, 703 (1951)
91. Stadtman, E.R.: J. Biol. Chem. 196, 535 (1952)
92. Stadtman, E.R., Dourdoroff, M. and Lipman, F.:
J. Biol. Chem. 191, 377 (1951)
93. Stadtman, E.R.: Methods in Enzymology III,
p. 931, Edit.: Colowick, S.P.
und Kaplan, N.O., Academic
Press Inc. Publ., New York 1957
94. Stern, J.R., Ochoa, S. und Lynen, F.:
J. Biol. Chem. 198, 313 (1952)
95. Stern, J.R., Coon, M.J., Del Campillo, A.:
Nature 171, 28 (1953)
96. Stetten, D. jr. und Boxer, G.E.:
J. Biol. Chem. 156, 271 (1944)
97. Stetten, D. jr.: J. Amer. Med. Ass. 150, 971
(1952)
98. Tabor, H., Mehler, H.A. and Stadtman, E.R.:
J. Biol. Chem. 204, 127 (1953)
99. Tavormina, P.A., Gibbs, M.H. and Huff, J.W.:
J. Amer. chem. Soc. 78,
4498 (1956)
100. Thompson, A.R.: Aust. J. Sci. Res., Ser. B.4,
100 (1951)
101. Wakil, S.J.: J. Amer. chem. Soc. 80, 6465
(1958)
102. Wakil, S.J., Titchener, E.B. and Gibson, D.M.:
Biochim. Biophys. Acta
29, 225 (1958)
103. Walker, P.G.: Biochem. J. 58, 699 (1954)
104. Warburg, O. und Christian, W.:
Biochem. Z. 310, 384 (1941)
105. Weinhouse, S., Medes, G. and Floyd, N.F.:
J. Biol. Chem. 158, 411 (1945)
106. Weinhouse, S., Medes, G., Floyd, N.F. and Noda, N.:
J. Biol. Chem. 161, 745 (1945)

107. Wieland, H.: Ergebn. d. Physiol. XX, 477
 (1922)
108. Wieland, O. und Weiss, L.:
 IV. Internat. Kongr. f. Bio-
 chemie Zusammenfassungen,
 S. 158, Wien 1958
109. Wieland, O., Löffler, G., Weiss, L. und
 Neufeldt, I.: Biochem. Z. 333, 10 (1960)
110. Wieland, O., Matschinsky, F., Löffler, G. und
 Müller, U.: Biochim. Biophys. Acta 53,
 412 (1961)
111. Wieland, O. et al.:
 In Vorbereitung
112. Wieland, O.: 8. Kolloquium der Gesellschaft
 f. physiol. Chemie, Mosbach,
 Baden 1957
113. Wieland, O.: Klin. Wochr. 32, 385 (1954)
114. Wieland, O. und Neufeldt, I.:
 Hoppe-Seyler 324, 101 (1961)
115. Wieland, O., Reinwein, D. und Lynen, F.:
 Biochem. Probl. of lipids,
 S. 155 London: Butterworths
 Scient. Publ. 1956
116. Wieland, O.: Persönliche Mitteilung
117. Wieland, O.: Diabetes-Kongreß, Genf 1961
118. Wieland, O., Neufeldt, I., Numa, S. u. Lynen, F.:
 Biochem. Z., 336, 455 (1963)
119. Wieland, O. und Neufeldt-Eger, I.:
 In Vorbereitung
120. Wieland, O. und Weiss, L.:
 Biochem., Biophys. Res. Comm.
 2, 333 (1963)
121. Wong, R.K.L. und van Bruggen, J.T.:
 J. Biol. Chem. 235, 26 (1960)
122. Wyshak, G.H. and Chaikoff, I.L.:
 J. Biol. Chem. 200, 851 (1953)

Lebenslauf

Am 14. Oktober 1936 wurde ich, Ludwig Weiß, als Sohn des Musiklehrers Maximilian Weiß und seiner Ehefrau Karolina, in München geboren. Nach vierjährigem Volksschulbesuch trat ich 1946 in das Alte Realgymnasium in München ein. Von dort wechselte ich 1949 in die Gisela-Oberrealschule in München über, wo ich 1954 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1954/55 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität München. Am 25. Juli 1957 bestand ich hier die ärztliche Vorprüfung. Am 31. Juli 1959 heiratete ich meine Frau Anna, geb. Kerschbaumer. Mit dem Staatsexamen beendete ich am 14. Dezember 1960 an der Universität München das Studium der Medizin.

Am 17. Oktober 1961 wurde unsere Tochter Ursula Weiß geboren.

Von Januar 1961 bis Dezember 1962 arbeitete ich als Medizinalassistent an der II. Medizinischen Klinik, an der II. Frauenklinik und an der Chirurgischen Klinik der Universität München.

